

**Tierexperimentelle Untersuchungen
zur Eignung von Mitoxantron
in der adjuvanten Therapie
maligner Gliome**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus – Liebig – Universität Gießen

vorgelegt von
Jendretzky, Johanna Barbara
aus
Kassel

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie

Institut für Neuropathologie

Leiter: Prof. Dr. med. W. Schachenmayr

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Schachenmayer

Gutachter: PD Dr. Winking

Tag der Disputation: 2. Mai 2002

Inhaltsverzeichnis

Einleitung S.1

- 1.1. Gliome - Inzidenz und Klassifikation S.1
- 1.2. Bisherige Behandlungsmodalitäten und Behandlungserfolge anaplastischer Gliome S.2

Fragestellung S.6

- 2.1. Traten Unterschiede in der Überlebenszeit behandelter und unbehandelter Tiere auf? S.6
- 2.2. Bestehen computertomographisch messbare Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Auftretens von nach Tumorzellimplantation entstandenen Hirntumoren bei behandelten und unbehandelten Kaninchen? S.6
- 2.3. Finden sich histologisch Unterschiede in Größe, Ausdehnung sowie hinsichtlich regressiver Veränderungen (Hämorrhagien, Nekrosen) der Tumore bei behandelten und unbehandelten Tieren? S.6
- 2.4. Welche histologischen Befunde ergeben sich beim Vergleich behandelter und unbehandelter Tumore an einem definierten Tag (n=4)? S.6
- 2.5. Welche Ergebnisse zeigt die histologische Auswertung von Lunge und Leber im Hinblick auf das Vorliegen von Fernmetastasen in den Vergleichsgruppen? S.6

3. **Material und Methoden** S.7

- 3.1. Art und Herkunft der Tiere S.7
 - 3.1.1. Kennzeichnung der Tiere S.7
- 3.2. Narkose S.7
- 3.3. Implantierte Tumorzellen S.7
- 3.4. Herkunft und Aufarbeitung der Tumorzellen S.8
- 3.5. Gruppeneinteilung, Randomisierung S.9
- 3.6. Implantation der Tumorzellen S.10
- 3.7. Postoperative Beobachtung S.11

- 3.8. Applikation der Chemotherapie S.11
- 3.9. Durchführung von Computertomographien S.11
- 3.10. Tötung der überlebenden Tiere S.12
- 3.11. Entnahme von Gehirn, Leber und Lunge S.13
- 3.12. Fixation der Organe S.14
- 3.13. Makroskopische Dokumentation S.14
- 3.14. Histologische Aufarbeitung S.15
- 3.15. Histologische Auswertung S.17

- 4. **Ergebnisse** S.19
 - 4.1. Nicht auswertbare Tiere S.20
 - 4.2. Klinische Manifestation des Tumors S.20
 - 4.3. Überlebenszeiten S.23
 - 4.4. Ergebnisse der Computertomographien S.26
 - 4.5. Ergebnisse der histologischen Auswertung S.28
 - 4.5.1. Tumorgroße S.32
 - 4.5.2. Ausdehnung, regressive Veränderungen S.37
 - 4.5.3. Lokalisation, Infiltration von kontralateraler Hemisphäre, Meningen, Ventrikelsystem oder Knochen S.40
 - 4.5.4. Histologischer Vergleich am 26. Tag nach intracerebraler Tumorzellimplantation S.42

- 5. **Diskussion** S.44

- 6. **Zusammenfassung** S.55

- 7. **Literaturverzeichnis** S.57

1. Einleitung

1.1. Gliome - Inzidenz und Klassifikation.

Etwa 2% aller menschlicher Tumoren treten im Nervensystem auf (40). Die Mehrzahl dieser Geschwülste sind Gliome, entstehen also aus Zellen der Neuroglia wie Astrozyten und Oligodendrozyten.

Die Dignität wird dabei nach Empfehlung der WHO nach pathologisch- anatomischen Kriterien in vier Stufen eingeteilt. Grad I gilt als benigne, Grad II als „semibenigne“, Grad III als „semimaligne“ und mit Grad IV werden hochmaligne Tumore eingestuft.

Zu den häufigsten hirneigenen Tumoren zählen mit über 30% die Astrozytome, sie wachsen meist langsam, etwa ein Drittel ist jedoch maligne. Rezidive weisen häufig einen höheren Malignitätsgrad auf als Ersttumore (36). Die Astrozytome haben Ihren Altersgipfel in der 4. Lebensdekade und sind im Kindesalter oft im Kleinhirn, im Erwachsenenalter meist im Großhirn zu finden.

Oligodendrogliome machen etwa 15% der Gliome aus. Sie finden sich meist in den Großhirnhemisphären und häufen sich im 4. und 5. Lebensjahrzehnt. Auch hier sind anaplastische Formen (WHO Grad III) in etwa einem Drittel der Fälle vertreten.

Eine kleine Gruppe der neuroepithelialen Geschwülste bilden mit 6 - 8% die Ependymome. Da die Ependymzellen normalerweise die liquorgefüllten Hohlräume des zentralen Nervensystems auskleiden, treten die Ependymome im Bereich der Ventrikel auf, können aber auch im Rückenmark vorkommen. Die supratentoriellen Ependymome bevorzugen keine bestimmte Altersgruppe, während sich die infratentoriellen Ependymome vorwiegend im Kindesalter manifestieren. Ependymome wachsen in der Regel langsam, können aber auch maligne entarten.

Der bösartigste Tumor der Gliareihe (WHO Grad IV) ist mit einer Häufigkeit von 45 - 50% das Glioblastom. Es bevorzugt Männer zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr und findet sich in der Regel in den Großhirnhemisphären. Hier ist es häufig im Frontal- und Temporallappen lokalisiert und greift oftmals schmetterlingsförmig über den Balken auf die Gegenseite über. Histologisch zeigt sich ein buntes Bild aus Nekrosen, Hämorrhagien, zystischen Zerfallshöhlen und zellreichen Anteilen entdifferenzierter Tumorzellen, die im Rahmen der Zellpolymorphie Riesenformen annehmen können. Typisch ist auch eine ausgeprägte Gefäßproliferation

1.2. Bisherige Behandlungsmodalitäten und Behandlungserfolge anaplastischer Gliome

Primärtherapie der Wahl bei Gliomen ist nach wie vor die chirurgische Intervention, da durch keine andere Maßnahme, auch bei nicht komplett entfernbarem Tumor, eine raschere Reduktion der Tumormasse und somit Reduktion der durch den Tumor selbst oder die konsekutive intrakranielle Drucksteigerung verursachten Symptome beseitigt oder zumindest gelindert werden können (71). Ferner sind nur bei einer gesicherten histologischen Diagnose eine weitere Therapieplanung und prognostische Aussagen möglich.

Obwohl jedoch in den letzten Jahren die neurochirurgischen Verfahren immer weiter verfeinert und verbessert werden konnten und die operationsbedingte postoperative Letalität und Morbidität auf ein Minimum reduziert werden konnte (2, 19), hat sich an der schlechten Prognose der Patienten mit der Diagnose: Glioblastom oder Astrozytom WHO Grad III kaum etwas geändert. In einer umfangreichen Studie von Wüllenweber und Kuhlendahl (Zit.in: 45) sind diese ungünstigen Ergebnisse ausführlich berichtet worden. Die Abbildung 1 zeigt die Überlebensraten verschiedener Gliomtypen in vereinfachter Form.

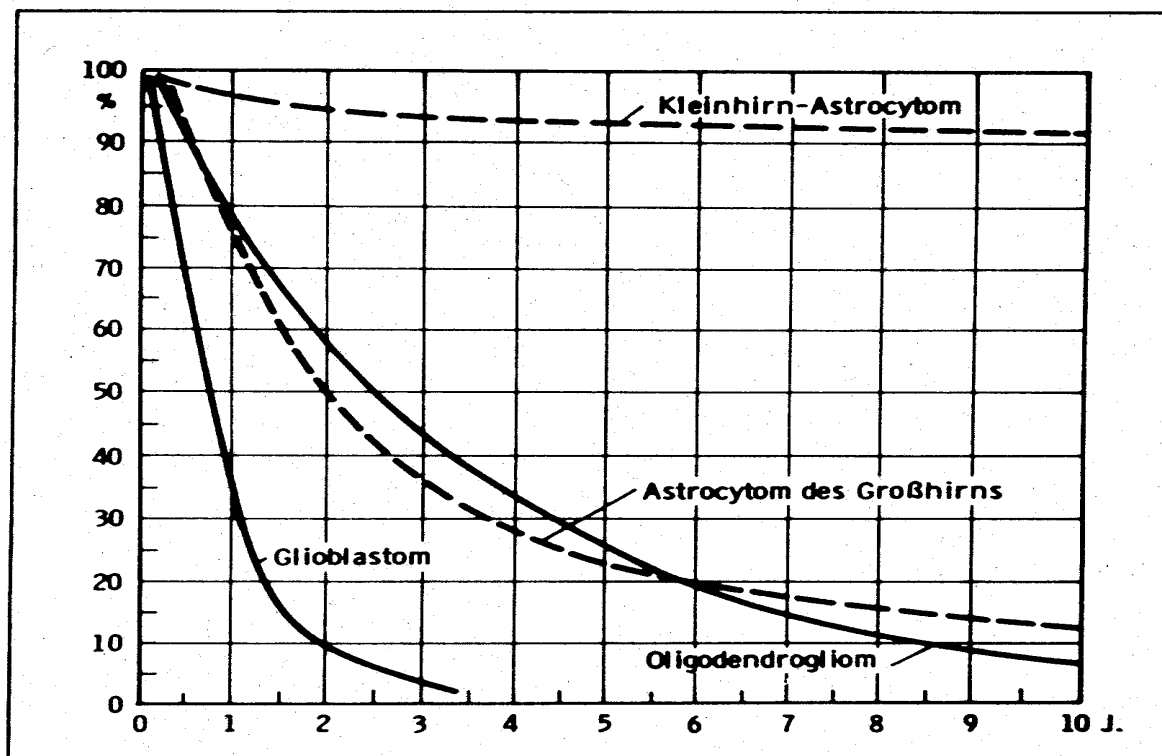


Abb. 1. Überlebensraten von Patienten mit unterschiedlichen Hirntumoren (aus: P. Krauseneck und H.G. Mertens, Therapie maligner Neoplasien des Gehirns, Perimed Erlangen 1983, S. 29)

Danach sterben 70% der Patienten mit einem Glioblastom innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung und nur 10% der Patienten leben länger als 2 Jahre. Es gibt daher umfangreiche Bemühungen, durch zusätzliche Therapieformen ein längeres Überleben unter guter Lebensqualität zu erreichen.

Von der mittlerweile zum Standard gewordenen Strahlentherapie, die, abhängig von Alter und Verfassung des Patienten, zum Einsatz kommt, ist ein günstiger Effekt auf den Krankheitsverlauf bekannt (54, 74, 91, 92). Jedoch sind auch die Möglichkeiten der Strahlentherapie begrenzt, da ab einer bestimmten Dosis mit dem gehäuften Auftreten von Nekrosen des umliegenden, gesunden Hirngewebes gerechnet werden muß (94). 60 Gy in Standardfraktionierung von 1,8 Gy bei Ganzschädelbestrahlung gelten allgemein als obere Grenze (10).

Es ist ferner bekannt, daß hypoxische Zellen um den Faktor 2-3 weniger strahlensensibel sind als gut oxygenierte Zellen. Da bei Kopf-, Hals- und Cervixtumoren diesbezüglich ermutigende Ergebnisse vorlagen (98), wurden daher Versuche mit einer Radiatio unter Sauerstoffüberdruckbeatmung unternommen ; sie brachten jedoch nicht den erhofften Erfolg (12). Auch die Bemühungen, mit einer Neutronenbestrahlung wegen deren höherer biologischer Tumorwirksamkeit und ihrer größeren Unabhängigkeit von der Zelloyxygenierung bessere Heilungsraten zu erzielen, sind wegen des gehäuftten Auftretens von Nekrosen des umliegenden Gewebes wieder verlassen worden (6, 66).

Ebenso enttäuschte auch der Einsatz der als Radiosensitizer eingesetzten Substanzen Metronidazol und Misonidazol, wie in verschiedenen kontrollierten Studien gezeigt wurde (11, 63, 75, 86). Durch ihren Einsatz sollte die zytotoxische Wirkung der Bestrahlung auf die Tumorzellen erhöht werden.

Weitere Bestrebungen zielen darauf ab, durch eine interstitielle Brachytherapie mit radioaktiven Substanzen die Möglichkeit zu nutzen, durch eine fokussierte Bestrahlung eine höhere Strahlendosis unter Schonung des umliegenden Gewebes an den Tumor zu bringen und dadurch positiven Einfluß auf das Überleben der Patienten zu nehmen (29, 54, 67).

Weitere Hoffnungen gelten dem interstitiellen Einsatz von Chemotherapeutika direkt in die Tumorkhöhle im Anschluß an die Operation (9, 87) sowie der Immuntherapie maligner Gliome. Im Rahmen der Immuntherapie kamen bisher Interferon Alpha, Beta und Gamma allein oder in Kombination mit Chemotherapie zum Einsatz (8, 53, 57, 69).

Auch Versuche mit monoklonalen Antikörpern (1, 15, 95) sowie zytotoxischen Lymphozyten und Interleukinen (3, 47) wurden durchgeführt. Jedoch konnten auch auf diesen Gebieten bislang keine bahnbrechenden Erfolge erzielt werden

Auch die adjuvante Chemotherapie maligner Hirntumore konnte bisher keinen generellen Therapieerfolg sichern (43, 52). Allerdings ist unter den so behandelten Personen ein höherer Anteil Langzeitüberlebender (mehr als 18 Monate) zu verzeichnen. Von den bisher zum

Einsatz gekommenen Chemotherapeutika ist - neben dem Nitrosoharnstoffderivat ACNU - vor allem BCNU als Monosubstanz bisher am meisten verbreitet und zudem am wirksamsten (28, 30, 46, 71, 72, 73, 74, 79, 89, 91, 92). Kombinationstherapien konnten sich wegen ihrer ausgeprägten Nebenwirkungen bei nur geringfügig besserer Wirksamkeit nicht durchsetzen (34, 88). Auch die Gabe von BCNU mit gleichzeitiger Verabreichung von Fluosol und Sauerstoff zur besseren Zelloxygenierung und einer dadurch erhofften Steigerung der Wirksamkeit der Chemotherapie brachte nicht den erwünschten Erfolg (31).

Um bei möglichst geringen systemischen Nebenwirkungen der doch sehr toxischen Nitrosoharnstoffe einen möglichst hohen intratumoralen Medikamentenspiegel zu erreichen, wurden Versuche mit intraarterieller BCNU- Gabe unternommen (26, 32, 51, 96). Hierbei zeigten sich aber gravierende Nebenwirkungen wie Leukenzephalopathie und schwere Visusstörungen, so daß sich auch dieses Verfahren nicht durchsetzen konnte (4, 16, 33, 39, 41).

Die Angaben bezüglich der intraarteriellen Gabe von wasserlöslichem ACNU, das weniger toxisch sein sollte als das wegen seiner Lipidlöslichkeit in einer Alkoholzubereitung verabreichte BCNU, sind widersprüchlich. In einigen Versuchen erwies es sich lokal als so toxisch (raumfordernde Nekrosen), daß diese abgebrochen wurden (82, 83). Andere Autoren berichten in einem Erfahrungsbericht über 260 intraarterielle Infusionen mit ACNU über eine gute lokale Verträglichkeit (65). Jedoch waren die Ergebnisse dieser Behandlung einer systemischen Therapie nicht überlegen (65), so daß der Aufwand und die Belastung für die Patienten nicht gerechtfertigt erscheinen.

Die Bemühungen dieser Arbeit gelten daher dem Ziel, eventuell erreichbare Überlebensvorteile für Gliompatienten durch Verwendung des bisher wegen seiner fehlenden Lipidlöslichkeit kaum eingesetzten Mitoxantron als einer mit einem erträglichen Maß an Nebenwirkungen und einer geringen Einbuße an Lebensqualität verbundenen Monotherapie experimentell in einem Tiermodell zu überprüfen, nachdem Mitoxantron in vorausgegangenen in- vitro Tests eine hohe Wirksamkeit bei Gliomen hoher Malignität gezeigt hat (38, 64, 80).

2. Fragestellung

Zur Überprüfung der antineoplastischen Wirksamkeit einer systemischen intravenösen Therapie mit Mitoxantron bei der Chemotherapie intracranieller Tumore wurden im Kaninchen- Tiermodell folgende Kriterien herangezogen:

2.1. Traten Unterschiede in der Überlebenszeit behandelter und unbehandelter Tiere auf?

2.2. Bestehen computertomographisch messbare Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Auftretens von nach Tumorzellimplantation entstandenen Hirntumoren bei behandelten und unbehandelten Kaninchen?

2.3. Finden sich histologisch Unterschiede in Größe, Ausdehnung sowie hinsichtlich regressiver Veränderungen (Hämorrhagien, Nekrosen) der Tumore bei behandelten und unbehandelten Tieren?

2.4. Welche histologischen Befunde ergeben sich beim Vergleich behandelter und unbehandelter Tumore an einem definierten Tag (n=4)?

2.5. Welche Ergebnisse zeigt die histologische Auswertung von Lunge und Leber im Hinblick auf das Vorliegen von Fernmetastasen in den Vergleichsgruppen?

3. Material und Methoden

3.1. Art und Herkunft der Tiere

Für die experimentellen Untersuchungen wurden in der Hessischen Landesanstalt für Tierzucht, Neu-Ulrichstein, zu Versuchszwecken gezüchtete, männliche, weiße Neuseeländer Kaninchen im Alter unter einem Jahr und mit einem Durchschnittsgewicht von 3545 g (von 3050 - 4000 g) verwendet. Sie wurden in Einzelkäfigen bei Gabe handelsüblichen Trockenfutters und freiem Zugang zu Wasser gehalten. Am Tag vor der Operation fasteten die Tiere.

Eine Genehmigung des Regierungspräsidenten in Gießen für die Tierversuche lag vor.

3.1.1. Kennzeichnung der Tiere

Die Kennzeichnung der Kaninchen erfolgte vor Versuchsbeginn durch Eintätowieren einer willkürlichen Zahl in die Innenseite eines Ohres.

3.2. Narkose

Nach Legen einer Venenverweilkanüle in eine Ohrvene wurde durch Bolus- Injektion von 2,3 mg Xylacin/kg Körpergewicht (Rompun, Fa. Bayer, Leverkusen, Konzentration 20 mg/ml Lösung) und 10 mg Ketamin/kg Körpergewicht (Ketanest, Fa. Parke Davis, Berlin, Konzentration 50 mg/ml Lösung) eine Vollnarkose herbeigeführt. Bei Bedarf wurde mit 5,7 mg Ketamin/kg Körpergewicht/Viertelstunde nachdosiert.

3.3. Implantierte Tumorzellen

Verwendet wurde eine 1940 von Kidd und Rous aus einem viral induzierten SHOPE-Papillom gewonnene VX2- Tumorzelllinie (24).

Diese Zellen wachsen in vivo zu anaplastischen, vorwiegend in Lunge und Lymphknoten metastasierenden Tumoren. Eine Implantation wurde bisher erfolgreich in Leber, Lunge, Skelettmuskel, Niere, Subkutangewebe, Gehirn und, nach Injektion in die Arteria carotis interna, die vordere Augenkammer durchgeführt (17, 20, 21, 60, 99). Eine karzinomatöse Meningitis ist nach der intrathekalen Applikation des Tumors in die cisterna magna beschrieben (22). Nach Gabe von Kontrastmittel waren größere, solide Tumoren in CT, MRT und Angiographie darstellbar (21, 22, 59, 99).

3.4. Herkunft und Aufarbeitung der Tumorzellen

Die aus einer Zelllinie der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg stammenden Tumorzellen wurden im Zellkulturlabor des Zentrums für Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen weiter passagiert (s. Abb. 1). Sie wurden in einer Stammlösung aus 70% RPMI Nährmedium mit 20% foetalem Kälberserum und 10% DMSO aufgeschwemmt, in flüssigem Stickstoff bei minus 196°C eingefroren und bis zur Verwendung in einem entsprechenden Tiefkühlbehälter aufbewahrt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen im Wasserbad bei 30°C in 5 - 8 Min. aufgetaut. Anschließend wurde durch Zentrifugation das Nährmedium (s.o.) separiert und vorsichtig abpipettiert. Die gleiche Menge frischen Nährmediums, bestehend aus RPMI-Medium mit 10% foetalem Kälberserum, wurde hinzugegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. In einer Blutmischpipette (nach Thoma) wurde die Zellsuspension aufgezogen und mit Trypanblau (1%ig) aufgefüllt. Auf einem elektrischen Rüttler wurden die Phasen 2 Min. vermischt. Nach Verwerfen der ersten drei Tropfen wurden die angefärbten Zellen in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die nicht angefärbten, vitalen Zellen mit der 100-fachen Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgezählt. Die Zellzahl pro micro-l wurde durch Multiplikation mit dem Faktor 50 bestimmt.

Durch entsprechendes Verdünnen der Zellsuspension mit Nährlösung wurde die angestrebte Zellkonzentration (2×10^5 Zellen/25 micro-l) eingestellt.

Während des gesamten Arbeitsganges wurde die für den Versuch vorgesehene Zellsuspension auf Eis gelagert.

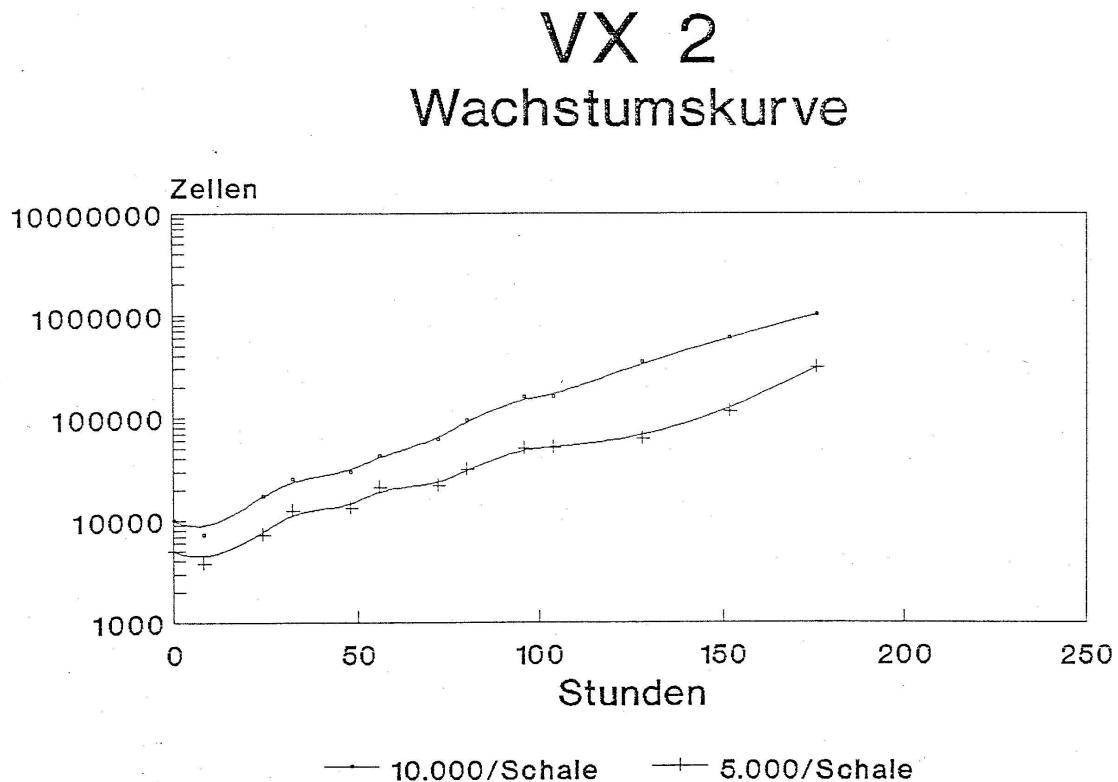


Abb. 1. Vermehrung der VX2- Tumorzellen in der Zellkultur in Abhängigkeit von der initialen Zellmenge.

3.5. Gruppeneinteilung, Randomisierung

Insgesamt wurden 26 Tierexperimente durchgeführt. Aus verfahrenstechnischen Gründen wurden sie in drei zeitlich aufeinander folgende Versuche aufgegliedert. Bei allen drei Versuchen bestanden die gleichen Konditionen. Jeweils die Hälfte der Tiere wurde durch Los der Mitoxantron- beziehungsweise der Kontrollgruppe zugeteilt.

Die ersten beiden Versuche umfaßten je 8 Tiere, der dritte Versuch wurde mit 10 Kaninchen durchgeführt

Die Nummernzuordnung zu den 3 Gruppen war wie folgt:

Versuch 1 Kaninchen Nr. 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83 und 84.

Versuch 2 Kaninchen Nr. 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 und 92.

Versuch 3 Kaninchen Nr. 15, 16, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 und 100.

Bei 18 Tieren wurde der Spontanverlauf hinsichtlich neurologischer Ausfälle und Überlebenszeit dokumentiert. Tiere, die länger als 8 Monate symptomfrei überlebten, wurden nach diesem Zeitraum getötet, da aufgrund der Wachstumskinetik der VX2- Tumorzellen nach dieser Zeit nicht mehr mit dem Auftreten eines Tumors zu rechnen war.

3 Tiere der Mitoxantrongruppe und eines der Kontrollgruppe wurden am 26. Tag getötet, um eine histologische Untersuchung an einem definierten Tag zu ermöglichen. Diese Tiere wurden per Los ermittelt.

Der 26. Tag wurde gewählt, da aus vorangegangenen Versuchen (35, 81) bekannt war, daß um diesen Zeitraum mit der klinischen Manifestation des Tumors und dem Ableben der Tiere gerechnet werden mußte. Diesem Ableben sollte, bei größtmöglicher Sicherheit des Vorliegens eines soliden Tumors, zugekommen werden.

3.6. Implantation der Tumorzellen

Nach Rasur und Desinfektion des Schädels in Vollnarkose (s. 3.2.) wurden die Tiere in Bauchlage ausgebunden. Dem Durchtrennen der Kopfhaut auf 2 cm Länge mit dem Skalpell folgte die Darstellung der rechten Kranznaht. In diesem Bereich wurde die Galea abgeschoben. Ca. 3 mm frontal der Koronarnaht und 3 - 5 mm paramedian rechts wurde mit einer kleinen Rosen- Fräse ein 2 mm großes, bis zur Dura mater reichendes Bohrloch angebracht.

In einer Spritze wurden 25 micro-l der vorbereiteten Tumorzellsuspension aufgezogen. Die Injektion erfolgte über eine Kanüle der Größe 0,45 x 12 mm in 4 mm Tiefe über einen Zeitraum von einer Minute. Nach Zurückziehen der Nadel erfolgte das sofortige Verschließen des Defektes mit Knochenwachs. Anschließend wurde die Hautwunde mit Prolene ® (Fa.

Braun, Melsungen) genäht und den Tieren zur Infektionsprophylaxe 2 ml Oxytetracyclin (Terramycin Injektions-lösung, Fa. Pfizer, Karlsruhe) i.m. injiziert.

3.7. Postoperative Beobachtung

Die Kaninchen wurden anfangs 2 x täglich, nach Auftreten von tumorverdächtigen Symptomen in 4 - 6 stündigen Intervallen auf motorische Ausfälle, Gleichgewichts- und Verhaltensstörungen hin untersucht. Dazu wurde das Spontanverhalten der Tiere beobachtet und durch Beobachtung des Bewegungsablaufes bei der Fortbewegung der Tiere auf das Vorhandensein oder Fehlen motorischer Ausfälle oder von Gleichgewichtsstörungen geschlossen. Weiterhin wurde der Tonus der Gliedmaßen überprüft.

3.8. Applikation der Chemotherapie

Am 12. postoperativen Tag wurde jeweils die Hälfte der Tiere der Gruppen 1 - 3 einmalig 3 mg Mitoxantron (Novantron, Fa. Lederle, Wolfratshausen, Konzentration: 2 mg/ml Lösung) als 5- minütige Kurzinfusion über eine Venenverweilkanüle in eine Ohrvene verabreicht.

Dies entspricht der beim Menschen zur intravenösen Behandlung empfohlenen Dosis von 14 mg Mitoxantron pro Quadratmeter Körperoberfläche.

3.9. Durchführung von Computertomographien

Jeweils am 12. Tag (dem Tag der Mitoxantronapplikation) und am 19. postoperativen Tag, bei einigen Tieren auch am 26. postoperativen Tag (Nr. 85, 88 und 91) wurden in Vollnarkose (s. 3.2.) craniale Computertomographien an den Geräten Somatom Plus und Somatom Hi Q der Firma Siemens, Erlangen, abgeleitet.

Die Ableitungsparameter für das Gerät Somatom Hi Q waren:

Schichtdicke 2 mm

Vorschub 2 mm

Scan-Zeit 2,7 sec.

Röhrenstrom 190 mAs

Röhrenspannung 133 kV.

Für das Gerät Somatom Plus waren die Ableitungsparameter:

Schichtdicke 2 mm

Vorschub 2 mm

Scan-Zeit 2 sec.

Röhrenstrom 250 mAs

Röhrenspannung 120 kV.

Die Untersuchungen erfolgten jeweils nativ und nach Gabe von Jopamidol (Solutrast, Firma Byk Gulden, Konstanz) in einer Dosierung von 2 ml/kg Körpergewicht.

3.10. Tötung der überlebenden Tiere

Die nach dem Versuchsprotokoll zu einem bestimmten Zeitpunkt zu tötenden Kaninchen (Nr. 79, 81, 83 und 91) wurden am 26. Tag zur Entnahme von Gehirn, Leber und Lunge eingeschläfert.

Dazu wurde nach Einleitung einer Narkose (s. 3.2.) und nach Rasur und Desinfektion von Thorax und Schädel in Rückenlage durch eine Überdosis eines Narkotikums ein Herz-, Kreislauf- und Atemstillstand induziert und nach Eröffnung des Thorax die Aorta durchtrennt. Die nach Mitoxantron- Gabe langzeitüberlebenden Tiere (Nr. 16, 96 und 100) wurden nach 8 Monaten auf die gleiche Weise getötet.

3.11. Entnahme von Gehirn, Leber und Lunge

Bei den aufgrund des Tumorleidens spontan verstorbenen Tieren wurde ebenso wie bei den getöteten weiter verfahren:

Der Eröffnung des Bauch- und Brustraumes und dem Durchtrennen der Aorta folgte die Entnahme von Leber und Lunge zur pathologischen Beurteilung. Die Organe wurden vorsichtig, unter teils stumpfer, teils scharfer Durchtrennung ihrer Gefäße und umgebenden Strukturen herauspräpariert und in 4%igem Formalin immersionsfixiert.

Die weitere Präparation erfolgte in Bauchlage. Die Kopfhaut wurde nach Durchtrennen mit dem Skalpell stumpf abpräpariert, bis die Kalotte komplett freigelegt war. Die Nackenmuskulatur wurde unterhalb des Hinterhauptes bis auf die Wirbelsäule durchtrennt und vom knöchernen Schädel abpräpariert. Das Neurokranium wurde von der hinteren Schädelgrube aus mit einer Hohlmeißelzange nach LUER eröffnet. Anschließend wurde die Kalotte von occipital nach frontal zusammen mit der Dura vorsichtig entfernt.

Im Falle einer makroskopisch sichtbaren Kalotteninfiltration durch den Tumor wurden diese Teile am Gehirn belassen und sorgfältig um dieses Areal herumpräpariert. Nach kompletter Freilegung der Gehirnoberfläche wurden die Nervi olfactorii vorsichtig durchtrennt. Anschließend wurde das Gehirn mit einem stumpfen Spatel vorsichtig und unter teils scharfer, teils stumpfer Durchtrennung der kaudalen Hirnnerven aus der Schädelkapsel gehoben. Zuletzt wurde mit einer spitzen Schere das Rückenmark möglichst tief kaudal durchtrennt. Nach dem Ausmessen des an der Gehirnoberfläche sichtbaren Tumoranteils wurde das Gehirn in 4%iger wässriger Formaldehydlösung immersionsfixiert.

3.12. Fixation der Organe

Zur Fixierung wurden die Kaninchengehirne 5 Tage lang in 4%igem Formalin gelagert, bevor sie zur weiteren Konservierung in 70%igen Alkohol überführt wurden.

Leber und Lunge mußten, um eine optimale Fixierung zu gewährleisten, jeweils 10 Tage in 4%igem Formalin belassen werden. Danach wurden sie in 70%igem Alkohol gelagert.

3.13. Makroskopische Dokumentation

Die Kaninchengehirne wurden makroskopisch nach den folgenden Kriterien beurteilt:

- Vorliegen eines makroskopisch sichtbaren Tumors.
- Lokalisation des Tumors.
- Größe des Tumors.
- Übergreifen des Tumors auf die kontralaterale Hemisphäre.

Nach fotografischer Dokumentation der Gehirne von der Konvexitäts- und Basalseite wurden sie - nach Abtrennen des infratentoriellen Segmentes - in frontale Schnittserien zerlegt. Die Schnittdicke betrug ca. 0,4 cm.

Hierbei wurde besonders darauf geachtet, daß eine Schnittebene möglichst durch die entsprechende CT- Ebene mit der größten Tumorausdehnung führte. Zur Orientierung diente das Chiasma opticum, das sowohl auf den CT- Bildern als auch am Präparat gut zu erkennen war.

Auch das infratentorielle Segment wurde lamelliert.

Danach wurden die einzelnen Hirnscheiben erneut fotografiert und Scheiben aus dem Frontal-, Parietal- und Occipitalpol sowie aus Hirnstamm und Kleinhirn in Paraffin eingebettet.

Lunge und Leber der Tiere wurden ebenfalls in Scheiben geschnitten und makroskopisch auf Metastasen untersucht. Alle makroskopisch auf Tumorwachstum suspekten Organscheiben wurden zur weiteren histologischen Aufarbeitung in Paraffin eingebettet.

Bei makroskopisch unauffälligem Befund wurde jeweils nur eine Scheibe der Organe zur histologischen Beurteilung in Paraffin eingebettet.

3.14. Histologische Aufarbeitung

Die Präparate wurden im Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter Prof. Dr. W. Schachenmayr) angefertigt und unter einem Leitz Lichtmikroskop ausgewertet.

Das Material wurde in der üblichen Weise in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Grundschlittenmikrotom der Fa. Leitz/Wetzlar wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Bei fehlendem makroskopischen Tumornachweis in den Gehirnen wurden zur Darstellung des Injektionskanals Serienschnitte jener Hirnscheiben angefertigt, in denen die Injektionsstelle vermutet wurde.

Neben einer Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) wurden die Schnitte mit Kresylviolett nach NISSL und der Trichromfärbung nach MASSON-GOLDNER gefärbt. Die HE-Färbung erfolgte, indem die entparaffinierten Schnitte in Aqua dest. verbracht und anschließend 3 - 8 min. zur Kernfärbung in Hämalun eingestellt wurden. Nach anschließendem Spülen in Aqua dest. und 10-minütigem Bläuen in fließendem Leitungswasser wurden sie 5 - 15 Min. in Eosin, 0,1% in Aqua dest., gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in Wasser ausgewaschen und in 80%igem Äthanol differenziert. Danach wurden sie 2 x 2 Min. in 96 - 100%iges Äthanol und 3 - 5 Min. in Xylol verbracht und anschließend mit Einschlußmittel (Mikrokitt) eingedeckelt.

Zum Nachweis von Hämosiderinablagerungen im Gewebe als Folge älterer, resorbierter Blutungen wurde die Berliner-Blau-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden die entparaffinierten Schnitte durch die Alkoholreihe in Wasser gebracht und 5 Min. in einer wässrigen Kaliumferrozyanidlösung eingestellt. Anschließend wurden sie 30 Min. in einer Mischung aus gleichen Teilen 20%iger HCL und 10%iger Kaliumferrozyanidlösung eingestellt und sorgfältig in Wasser ausgewaschen. Nach einer 5-minütigen Gegenfärbung mit Kernechtrot erfolgte eine weitere Spülung in Aqua dest., die aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und das Einschließen mit Eindeckmittel.

Um den Injektionskanal bei den tumorfrei überlebenden Tieren nachzuweisen, wurden die reaktiven Astrozyten im Narbenbereich immunhistologisch durch den Nachweis von gliafibrillärem saurem Protein (GFAP) mit der PAP- Methode dargestellt. Dazu wurden die Schnitte nach folgender Methode immunzytochemisch eingefärbt:

Entparaffinieren, absteigende Alkoholreihe, Aqua dest.

8 Min. 3% Wasserstoffperoxid

2 x spülen in Aqua dest.

2 x spülen in PBS-Triton

Einspannen der Präparate in den Sequenza - Immuncenter, 1 x mit PBS-Triton spülen

20 Min. normales Schweineserum (Dako x 901) 1:10 verd. mit 1% Alb.-PBS-Lsg.

60 Min. pk-Primär-AK in 1% Alb-PBS, ohne vorheriges Spülen; Inkubationszeit muß je nach AK und Konzentration angepaßt werden

2 x spülen mit PBS-Triton

30 Min. Brücken-AK (Dako Z 196) 1:50 in 1% Alb.-PBS

2 x spülen mit PBS-Triton

30 Min. PAP- Komplex (Dako Z 113) 1:100 in 1% Alb.-PBS

1 x spülen mit PBS-Triton

Präparate zurück in eine PBS-Triton- gefüllte Glasküvette stellen, 2 x spülen mit PBS-Triton

3 x spülen mit Trispuffer

5 - 10 Min. entwickeln mit DAB-Substrat

80 mg DAB in 160 ml Trispuffer lösen,

200 micro-l 30% Wasserstoffperoxid zugeben,

Lösung gleich verwenden

2 x spülen mit Trispuffer

Aqua dest., kurz

1 Min. Hämalaun nach Mayer (HE-Reihe)

2 Min. wässern

aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, eindecken

Im Ergebnis der Antigen- Antikörperreaktion zeigt sich eine braune Anfärbung des Zytoplasmas der Astrozyten einschließlich ihrer Zellfortsätze bei blau angefärbten Zellkernen.

3.15. Histologische Auswertung

Histologische Beurteilungskriterien waren:

- Fehlen oder Vorhandensein von Tumorzellen im Gehirngewebe,
- Lokalisation des Tumors,
- Ausdehnung des Tumors,
- Regressive Veränderungen des Tumors wie Hämorrhagien und Nekrosen,
- Tumorinfiltration von Leptomeninx und Schädelknochen,
- Übergreifen des Tumors auf die kontralaterale Hemisphäre

Die Auswertung erfolgte semiquantitativ, indem die Ausprägung der einzelnen Parameter von gering ausgeprägt bis stark ausgeprägt in fünf Stufen eingeteilt und beurteilt wurde.

Das heißt bezüglich der Tumorgroße:

Tumorgroße:

X	kleiner Tumor ohne Raumforderung
XX	kleiner Tumor mit gering raumfordernder Wirkung
XXX	Tumor mit deutlich raumfordernder Wirkung
XXXX	großer Tumor mit Verlagerung der Mittellinie und Kompression des Ventrikelsystems
XXXXX	Tumor, der sich an der Stelle seiner größten Ausdehnung über mehr als ein Viertel des gesamten Gehirnquerschnittes erstreckt.

Bezüglich der Nekrosen ist die Abstufung wie folgt:

Nekrose:

X	einzelne, kleine Nekrosen
XX	multiple, kleine Nekrosen
XXX	konfluierende Nekrosen
XXXX	ca. ein Viertel bis die Hälfte des Tumors ist nekrotisch
XXXXX	Tumor ist überwiegend nekrotisch.

Bei der Abstufung der Tumorblutungen bedeutet dies:

Einblutungen:

X	vereinzelt kleine Blutungen
XX	multiple, kleine Blutungen
XXX	konfluierende Blutungen
XXXX	ca. ein Viertel bis die Hälfte des Tumors ist hämorrhagisch
XXXXX	der Tumor ist weitgehend hämorrhagisch.

4. Ergebnisse

Insgesamt wurden 22 Tiere in die Versuchsauswertung einbezogen.

Tier-Nr.	Mitoxantron	Charge ¹	Tumor	CT 19. Tag ²	spont. gestorben	26. Tag getötet
16	ja	4	nein	-	überlebt ³	
76	ja	1	ja	-	25. Tag	
80	ja	1	ja	+/-	26. Tag	
81	ja	1	ja	+		X
83	ja	2	ja	-		X
86	ja	3	ja	-	31. Tag	
89	ja	3	ja	+	24. Tag	
91	ja	3	ja	+/-		X
94	ja	4	ja	+	27. Tag	
96	ja	5	nein	-	überlebt ³	
98	ja	5	ja	-	72. Tag	
100	ja	5	nein	-	überlebt ³	
15	nein	4	ja	-	34. Tag	
79	nein	1	ja	-		X
82	nein	2	ja	+	27. Tag	
84	nein	2	ja	+	23. Tag	
87	nein	3	ja	+/-	24. Tag	
92	nein	3	ja	+	23. Tag	
93	nein	4	ja	+	30. Tag	
95	nein	4	ja	+	22. Tag	
97	nein	5	ja	+/-	45. Tag	
99	nein	5	ja	-	27. Tag	

Tab.1

1. Charge: Eine Charge entspricht jeweils einer Kuvette frisch aufgetauter, vitaler Tumorzellen.
2. CT: CT +: Tumor in der CT sicher nachweisbar; CT +/-: Tumor fraglich ; CT -: zu diesem Zeitpunkt in der CT kein Tumor nachweisbar.
3. Überlebt: Diese Tiere entwickelten keinen Tumor und wurden nach 8 Monaten zum histologischen Nachweis des Stichkanals getötet, da nach dieser Zeit aufgrund der Wachstumskinetik der VX2-Tumorzellen nicht mehr mit dem Auftreten eines Tumors zu rechnen war.

4.1. Nicht auswertbare Tiere

Bei zwei Kaninchen war die Injektion zur Implantation der Tumorzellen fehlerhaft (Nr. 85, Nr. 88).

Tier Nr. 78 erlitt nach einer postoperativen Verletzung eine Lähmung der hinteren Extremitäten und musste eingeschläfert werden.

Tier Nr. 90 verstarb am 12. Tag durch einen narkosebedingten Atemstillstand bei Durchführung der für diesen Tag vorgesehenen Computertomographie.

Diese 4 Tiere wurden aus der Versuchsreihe herausgenommen.

4.2. Klinische Manifestation des Tumors

Die frühesten tumorbedingten Symptome traten bei einem Tier (Nr. 95) am 22. postoperativen Tag auf.

Ohne Symptomatik überlebten drei behandelte Tiere (Nr. 16, 96, 100) acht Monate, bei ihnen war auch histologisch kein Tumor nachweisbar.

Die Symptome reichten von Nahrungsverweigerung (8 Tiere), Gleichgewichtsstörungen (7 Kaninchen), einer deutlichen Seitabweichung bei der Fortbewegung bis hin zu Paresen. Bei einigen Tieren traten schwere Störungen der Motorik auf, so daß sich die Kaninchen nur noch rechts- (5 Tiere) bzw. linksherum- (3 Tiere) drehten, wenn sie auf den Boden gesetzt wurden. Bei 3 Tieren gingen allgemeine Gleichgewichtsstörungen einer deutlichen Seitabweichung voraus (Abb. 1).

Ein Kaninchen (Nr. 76) starb am 25. Tag nach der Tumorzellimplantation, ohne daß es - bei zuvor dreistündlich erfolgter Kontrolle - irgendwelche Symptome gezeigt hatte. In der Histologie fand sich ein großer, fronto- parietal gelegener Tumor mit leptomeningealer Aussaat.

Zwei der Tiere entwickelten Paresen. In einem Fall (Nr. 80) (die Histologie zeigte hier einen rechts fronto- parietal gelegenen Tumor mit Mittellinienverlagerung) trat eine schlaffe Lähmung des linken Hinterbeines auf; in dem anderen Fall (Nr. 84) betraf die schlaffe Lähmung das rechte Hinterbein (die Histologie zeigte hier einen großen, rechts fronto- parietal gelegenen Tumor mit Aussaat von Tumorzellen interhemisphärisch und leptomeningeal).

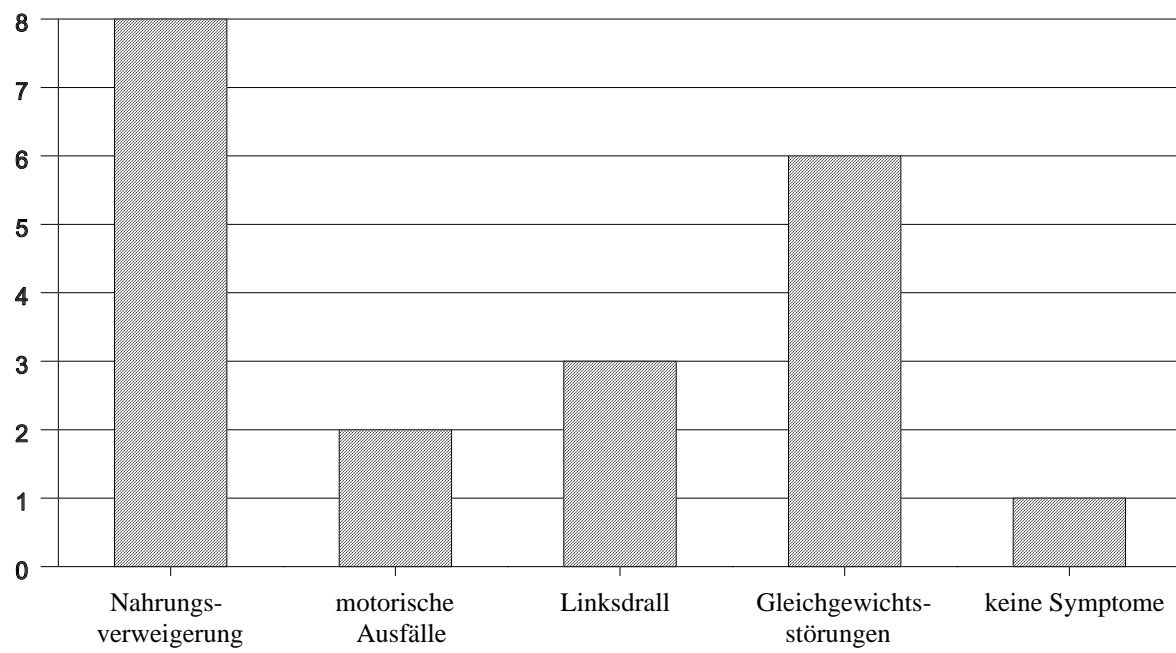


Abb. 1: Histogramm zur Häufigkeit der einzelnen Symptome bei den verstorbenen Tieren (n = 15)

Die Zeiträume vom Auftreten der ersten Symptome bis zum Tod der Tiere reichten von 0 bis 3 Tagen, lediglich ein Kaninchen (Nr. 15) lebte nach Auftreten von Krankheitszeichen noch 8 Tage (Abb.2). Hier fand sich histologisch ein fronto-parietaler Tumor, der große Teile der Hemisphären einnahm und die Ventrikel nahezu ausfüllte. Es bestanden außerdem eine leptomeningeale Aussaat basal parietal rechts sowie eine Absiedelung im Rückenmark. Klinisch zeigte das Tier eine Fortbewegung ausschließlich linksherum, so daß es zu einem kreisförmigen Bewegungsablauf kam. Zu diesen motorischen Störungen kam eine komplette Nahrungsverweigerung hinzu. Nach einer epileptischen Anfallsserie starb das Tier.

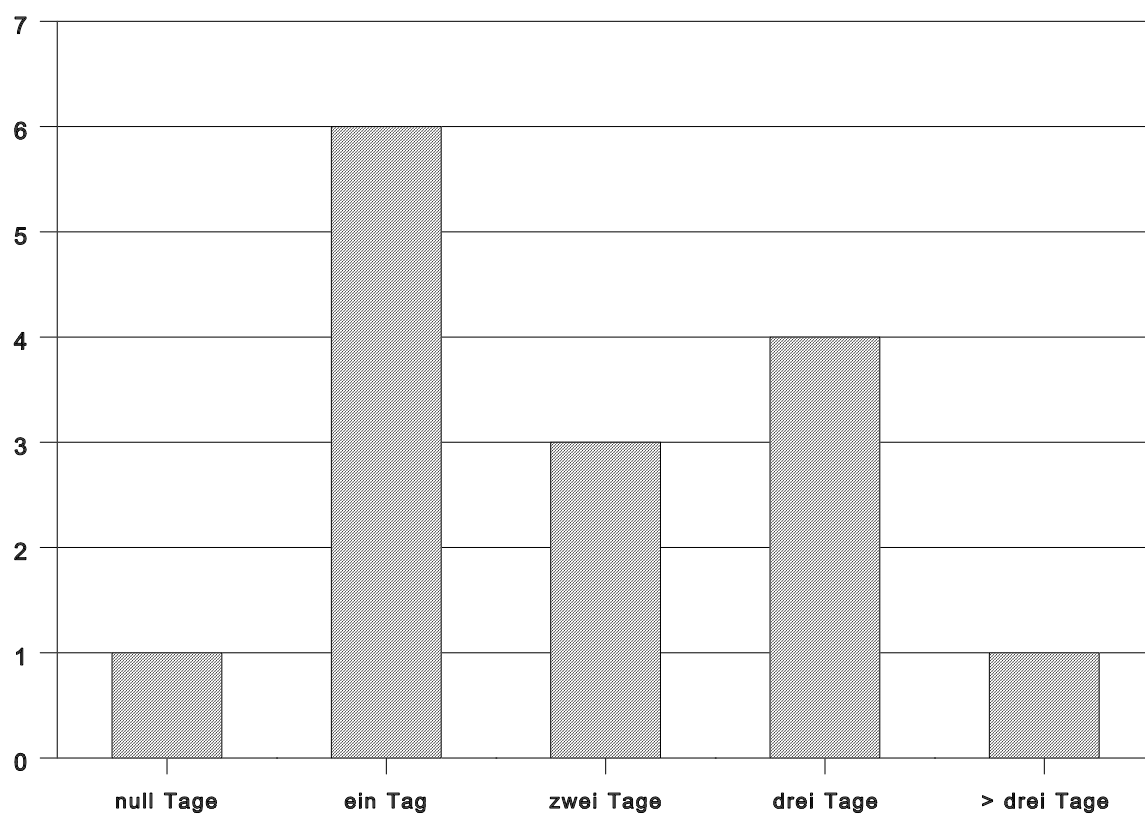


Abb. 2: Histogramm zum Zeitraum vom Auftreten der ersten Symptome bis zum Tod der Tiere (n = 15)

4.3. Überlebenszeiten

Die Überlebenszeiten bei den nicht behandelten Tieren ($n = 9$) reichten von 22 bis 45 Tagen (durchschnittlich 28,3 d). In der Gruppe der behandelten Tiere ($n = 9$) reichte die Überlebensspanne von 24 bis 72 Tagen (durchschnittlich 34,1d).

Drei der Mitoxantron- behandelten Tiere (Nr. 16, 96, 100) überlebten symptomfrei. Sie wurden nach 8 Monaten getötet und obduziert. Die implantierten Zellen stammten aus zwei verschiedenen Chargen, wobei eine Charge jeweils einer Kuvette frisch aufgetauter, vitaler Tumorzellen entspricht. Für Nr. 16 wurden Zellen aus Charge vier und für Nr. 96 und Nr. 100 Zellen aus Charge fünf verwendet (s. 4.0.).

In allen drei Fällen war bei makroskopisch und mikroskopisch fehlendem Tumor der vernarbte Stichkanal von der ehemals erfolgten Implantation der Tumorzellen histologisch nachweisbar, so daß von einer regelrechten Injektionstechnik ausgegangen werden kann. Abb.3 zeigt in der Ansicht von ventral ein histologisches Bild der Gehirnscheibe von einem der tumorfrei gebliebenen Tiere in der Ebene des gliös vernarbten Stichkanals in der rechten Hemisphäre parasagittal.



Abb. 3

In der Gruppe der behandelten Tiere ($n = 12$, abzüglich der 3 am 26. Tag getöteten Tiere, also im Spontanverlauf, $n = 9$) hatten 3 Tiere gar keinen Tumor entwickelt und ein Kaninchen war mit 72 Tagen als Langzeitüberlebendes einzustufen. Es haben also 4 Tiere (44%) länger als 2 Monate gelebt, in der Kontrollgruppe ($n = 10$ abzüglich eines am 26. Tag getöteten Tieres, also spontan gestorben ebenfalls $n = 9$) hat keines der Tiere (0%) diesen Zeitraum überlebt. Diese Daten (s.Abb.4) zeigen eine signifikant längere Überlebenszeit der behandelten Tiere ($p < 0,05$).

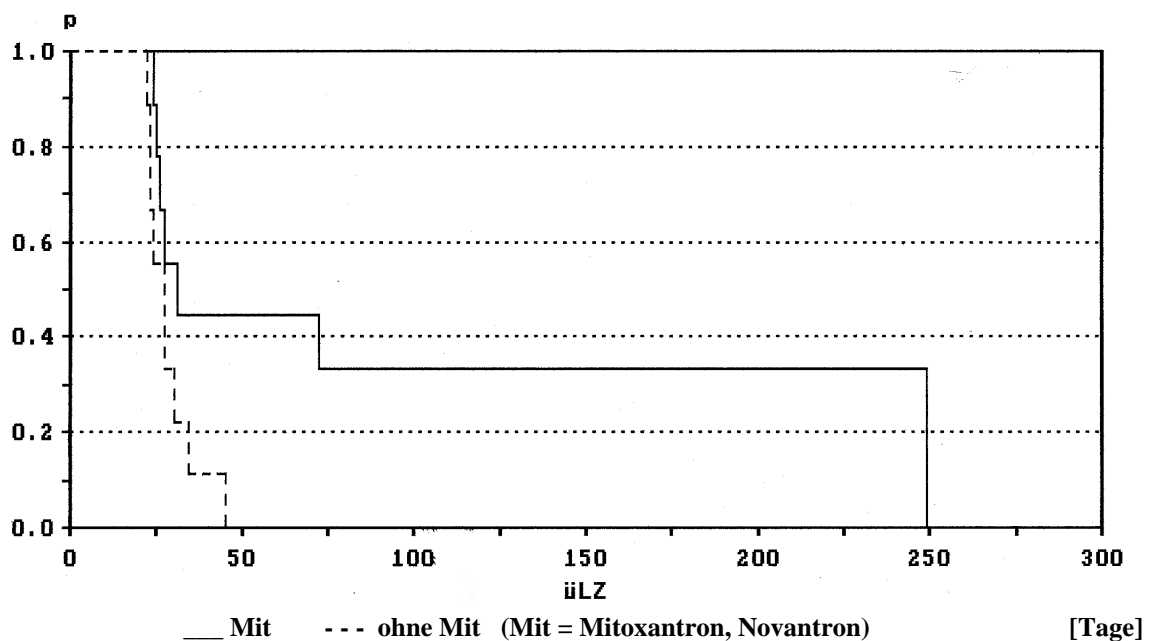


Abb. 4: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeiten der Versuchstiere

4.4. Ergebnisse der Computertomographien

In den am 12. postoperativen Tag abgeleiteten CTs (Computertomographien) fanden sich in keinem Fall sichere Hinweise auf das Vorliegen eines manifesten Tumors. Bei keinem Tier war eine Blutungskomplikation nachweisbar.

Die am 19. postoperativen Tag durchgeführten CTs (Abb. 5) zeigten dagegen bei den Tieren der Kontrollgruppe (n = 10) in 5 Fällen sichere Tumore, in 2 Fällen war ein Tumor fraglich und in 3 Fällen konnte kein Tumor gefunden werden. Bei den Kaninchen der Mitoxantrongruppe (n = 12) fanden sich in 3 Fällen sichere Tumore, 2 Fälle waren fraglich und in 7 Fällen konnte kein Tumor nachgewiesen werden.

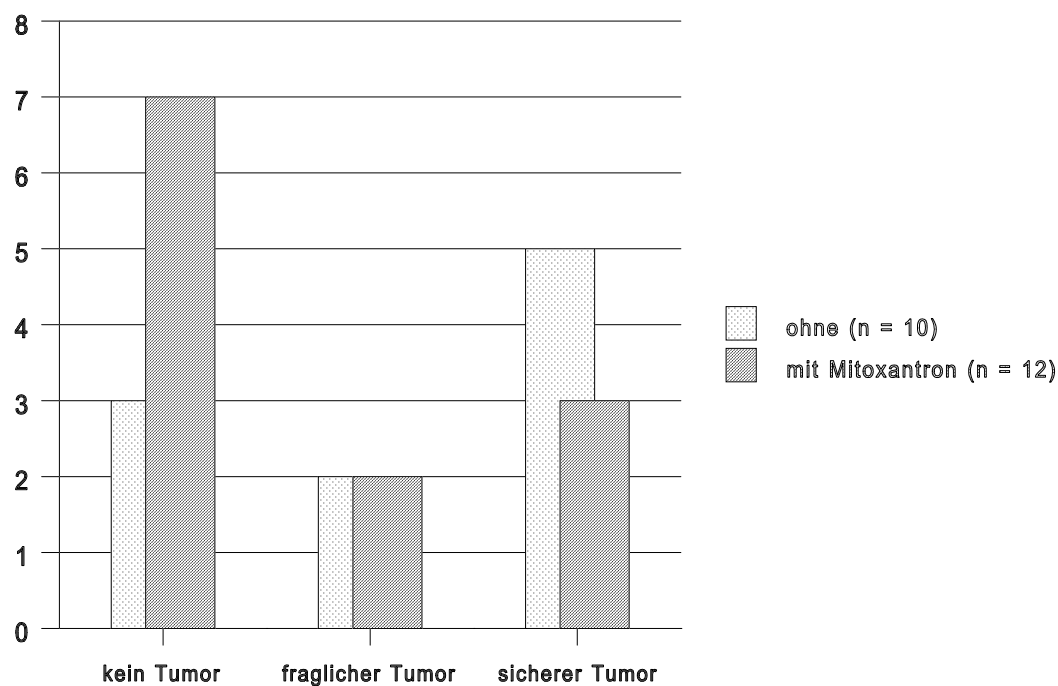


Abb. 5: Histogramm zum Tumornachweis in der Computertomographie am 19. Tag. (n = 22)

Abb. 6 zeigt ein CT-Bild eines intracerebralen VX2-Tumors bei einem Kaninchen nach intravenöser Gabe von Kontrastmittel.

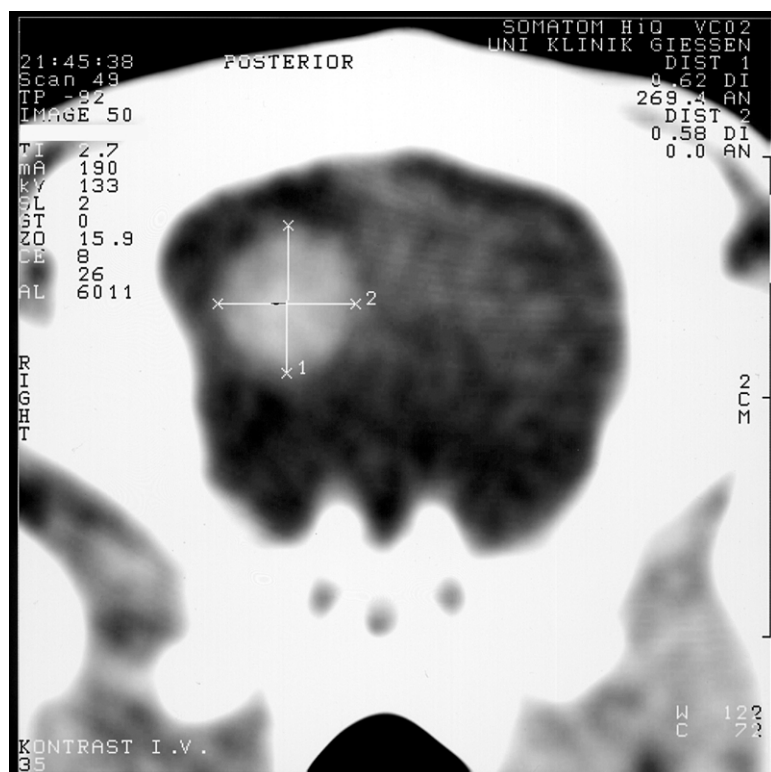


Abb. 6

4.5. Ergebnisse der histologischen Auswertung

Im Rahmen der histologischen Auswertung wurden die Tumorlokalisation, die an der Gehirnoberfläche messbare Tumorgröße und intracerebrale Ausdehnung, Tumorinfiltrationen in Nachbarregionen sowie regressive Veränderungen innerhalb der Tumore bei behandelten und unbehandelten Tieren bestimmt und miteinander verglichen.

Ferner wurden Lunge und Leber der Tiere auf Fernmetastasen untersucht.

Die Ergebnisse werden zunächst in tabellarischer Form komprimiert vorangestellt (Tab. 2 - 5) und nachfolgend unter dem Aspekt der Therapieeffekte im Detail verglichen.

Tier	Lokalisation							Infiltration					
	Mit.	Tu.	fro.	f.-p.	par.	p.-o.	occ.	Geg	Men	Ven	Kno	St.	Tod
16	X	nein										ja	-
76	X	ja		X					X				25.d
80	X	ja		X				X	X	X			26.d
86	X	ja		X	X	X	X		X	X	X		31.d
89	X	ja	X	X	X	X	X	X		X			24.d
94	X	ja		X				X	X				27.d
96	X	nein										ja	-
98	X	ja		X									72.d
100	X	nein										ja	-
15		ja		X					X	X			34.d
82		ja	X	X	X			X		X	X		27.d
84		ja		X					X				23.d
87		ja	X	X	X	X	X	X					24.d
92		ja	X	X	X	X	X	X	X	X			23.d
93		ja		X									30.d
95		ja		X				X	X				22.d
97		ja		X					X		X		45.d
99		ja		X					X				27.d

Tab. 2: Ergebnisse der histologischen Auswertung von Tumorlokalisierung und Tumordinfiltration in Nachbarregionen bei spontan gestorbenen Tieren.

Mit.:	Mitoxantron	Tu.:	Tumor	fro.:	frontal
f.-p.:	fronto-parietal	par.:	parietal	p.-o.:	parieto-occipital
occ.:	occipital	Geg:	Gegenseite	Men:	Meningen
Ven:	Ventrikel	Kno:	Knochen	St.:	Stichkanal lokalisierbar

Tier	Mitoxantron	Ausdehnung	Blutung	Nekrose
16	X	kein Tumor		
76	X	XXXX	XX	XX
80	X	XXXXXX	X	XXXX
86	X	XXXXXX	XX	XXX
89	X	XXXXXX	XXX	XXXX
94	X	XXXX	XXX	XXX
96	X	kein Tumor		
98	X	XXXXXX	XXXX	X
100	X	kein Tumor		
15		XXXX	XX	XXX
82		XXXXXX	X	XX
84		XXXX	XX	XX
87		XXXXXX	X	XX
92		XXXX	XXXXXX	XXX
93		XXXXXX	XX	XXXX
95		XXX	XX	XXX
97		XXXX	XX	XX
99		XXXX	XX	XXX

Tab. 3: Ergebnisse der semiquantitativen histologischen Auswertung von Tumorausdehnung und regressiven Veränderungen bei spontan gestorbenen Tieren.

Tier	Mit.	Tu.	fro.	f.-p.	par.	p.-o.	occ.	Geg	Men	Ven	Kno
81	X	X	X	X				X	X	X	
83	X	X	X						X	X	
91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
79		X	X								X

Tab.4: Ergebnisse der histologischen Auswertung von Tumorlokalisation und Tumorerinfiltration in Nachbarregionen bei 4 am 26. Versuchstag getöteten Tieren.

Mit.:	Mitoxantron	Tu.:	Tumor	fro.:	frontal
f.-p.:	fronto-parietal	par.:	parietal	p-o.:	parieto-occipital
occ.:	occipital	Geg:	Gegenseite	Men:	Meningen
Ven:	Ventrikel	Kno:	Knochen		

Tier	Mitoxantron	Ausdehnung	Blutung	Nekrose
81	X	XXXXXX	X	XXX
83	X	XX	XXX	XX
91	X	XXX	XXX	XX
79		XXXXXX	XXX	XXX

Tab. 5: Ergebnisse der semiquantitativen histologischen Auswertung der intracerebralen Tumorausdehnung und von regressiven Veränderungen bei 4 am 26. Versuchstag getöteten Tieren.

4.5.1. Tumorgröße

Bei Entnahme der Gehirne wurde der an der Gehirnoberfläche sichtbare Teil des Tumors ausgemessen. Die Erfassung der intracerebralen Ausdehnung erfolgte semiquantitativ auf einer Skala von 1 - 5 bei der histologischen Auswertung (s. 3.15).

Bei den Kaninchen der Kontrollgruppe wurde die kleinste an der Gehirnoberfläche sichtbare Tumorausdehnung bei einem Tier mit 0,25 cm² bestimmt, wobei histologisch eine Ausdehnung entsprechend einer Bewertung von 5 auf der semiquantitativen Skala vorlag. Dies bedeutet, daß die in der Tiefe des Gehirnes vorliegende Tumorausdehnung deutlich größer als der an der Gehirnoberfläche messbare Tumoranteil war.

Die größte gemessene Tumoroberfläche wies ein Tier der Kontrollgruppe mit 2,6 cm² bei einer Beurteilung von 3 auf der histologischen Ausdehnungsskala auf. Hier lag also ein großer, oberflächlich sichtbarer Tumoranteil bei im histologischen Schnittbild nur mäßiggradiger Tumorausdehnung vor. Bei den übrigen unbehandelten Kaninchen lag die an der Oberfläche messbare Tumorgröße zwischen 0,5 cm² und 2,28 cm² (Tab. 6).

Tier	Tod nach x Tagen	Tumorgröße	Ausdehnung
95	22	2,6 cm ²	XXX
92	23	1,2 cm ²	XXXX
84	23	2,4 cm ²	XXXX
87	24	0,6 cm ²	XXXXX
82	27	2,28 cm ²	XXXXX
99	27	2,16 cm ²	XXXX
93	30	0,25 cm ²	XXXXX
15	34	0,4 cm ²	XXXX
97	45	1,21 cm ²	XXXX

Tab 6: An der Gehirnoberfläche messbare Tumorgröße und semiquantitativ erfasste intracerebrale Tumorausdehnung bei unbehandelten Tieren (n = 9).

Bei den mit Mitoxantron behandelten Tieren war die kleinste an der Gehirnoberfläche messbare Tumorgroße bei einem Tier 0,49 cm² mit einer Ausdehnung von 5 auf der semiquantitativen Skala. Das heißt, auch hier bestand intracerebral ein deutlich größerer Tumor als er oberflächlich sichtbar war.

Bei den anderen Tieren der Verumgruppe fanden sich Tumorgroßen von 1,96 cm² bei 2 Tieren, sowie oberflächlich sichtbare Tumorausdehnungen zwischen 1,0 cm² und 1,8 cm² bei den übrigen chemotherapierten Kaninchen (Tab. 7).

Drei der mit Mitoxantron behandelten Tiere (Nr.16, 96, 100) entwickelten keinen makroskopisch oder mikroskopisch nachweisbaren Tumor (Tab. 7). In allen drei Fällen konnte bei der histologischen Aufarbeitung der Stichkanal lokalisiert werden.

Die mittlere, oberflächlich messbare Tumorgroße bei den behandelten Tieren betrug 1,48 cm², in der Kontrollgruppe 1,45 cm².

Tier	Tod nach x Tagen	Tumorgroße	Ausdehnung
89	24	1,96 cm ²	XXXXXX
76	25	1,8 cm ²	XXXX
80	26	1,96 cm ²	XXXXXX
94	27	1,68 cm ²	XXXX
86	31	0,49 cm ²	XXXXXX
98	72	1,0 cm ²	XXXXXX
16	hat überlebt	kein Tumor	-
96	hat überlebt	kein Tumor	-
100	hat überlebt	kein Tumor	-

Tab.7: An der Gehirnoberfläche messbare Tumorgroße und semiquantitativ erfasste intracerebrale Tumorausdehnung bei behandelten Tieren (n = 9).

Die Abbildung 7 illustriert beispielhaft den Tumorbefund der Gehirnaufsicht und die Abbildungen 8 und 9 zeigen die Tumorausdehnung in Gehirnscheiben von einem der mit Mitoxantron behandelten Tiere.

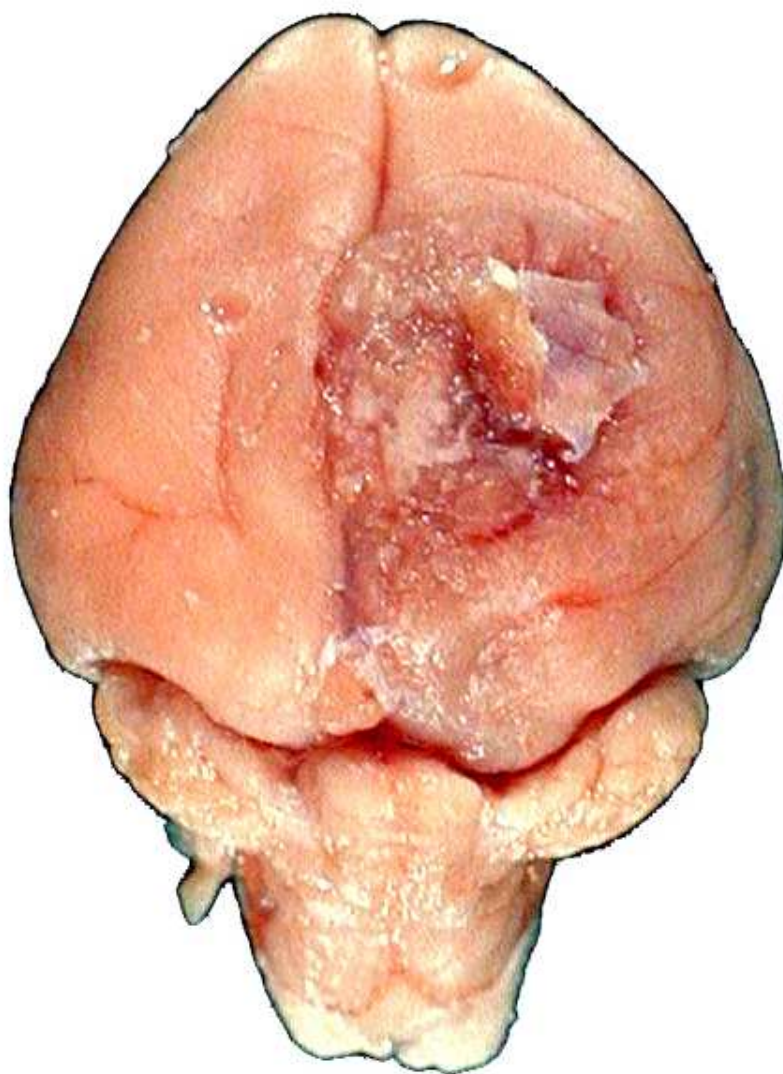


Abb. 7

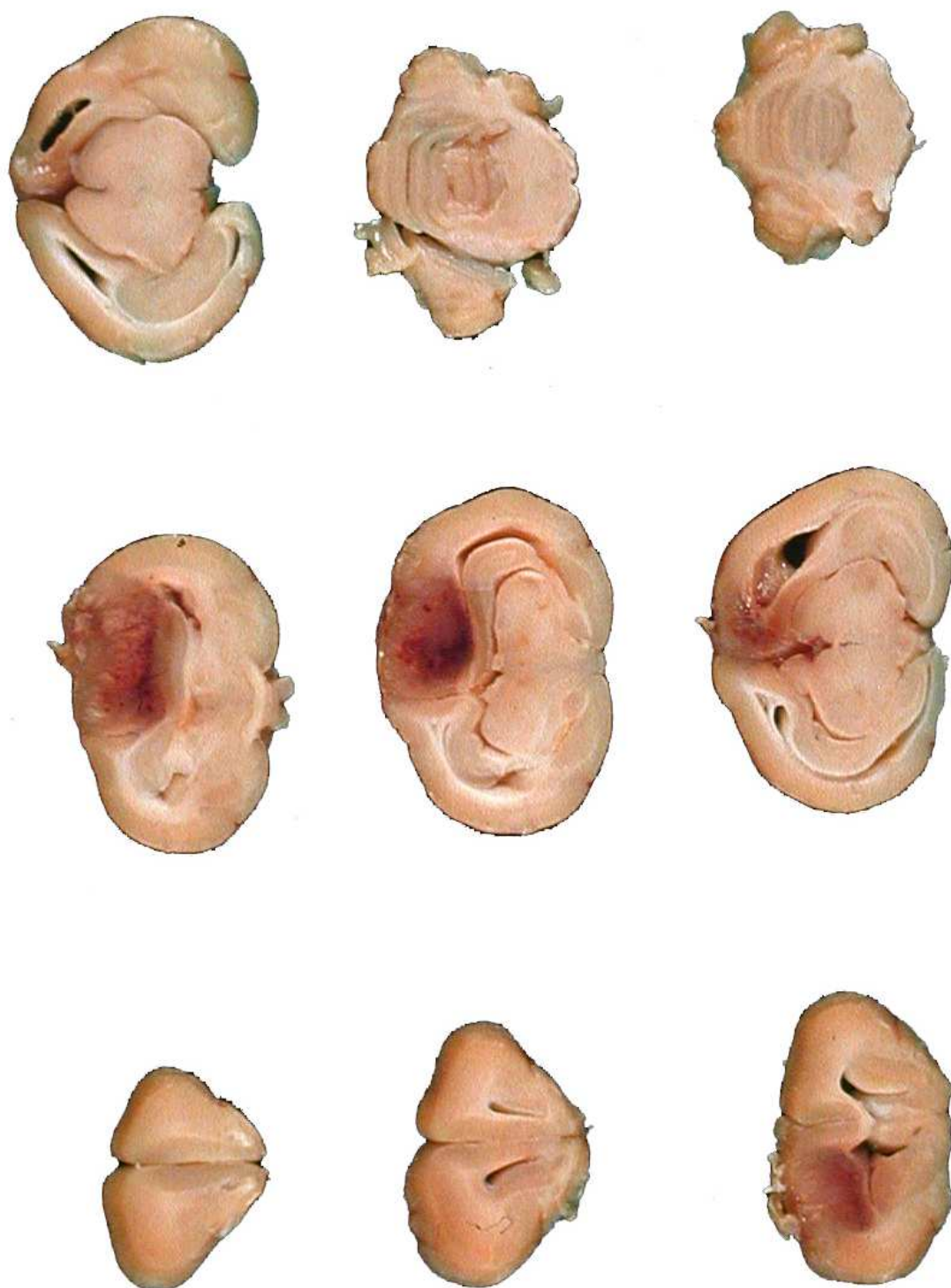


Abb. 8

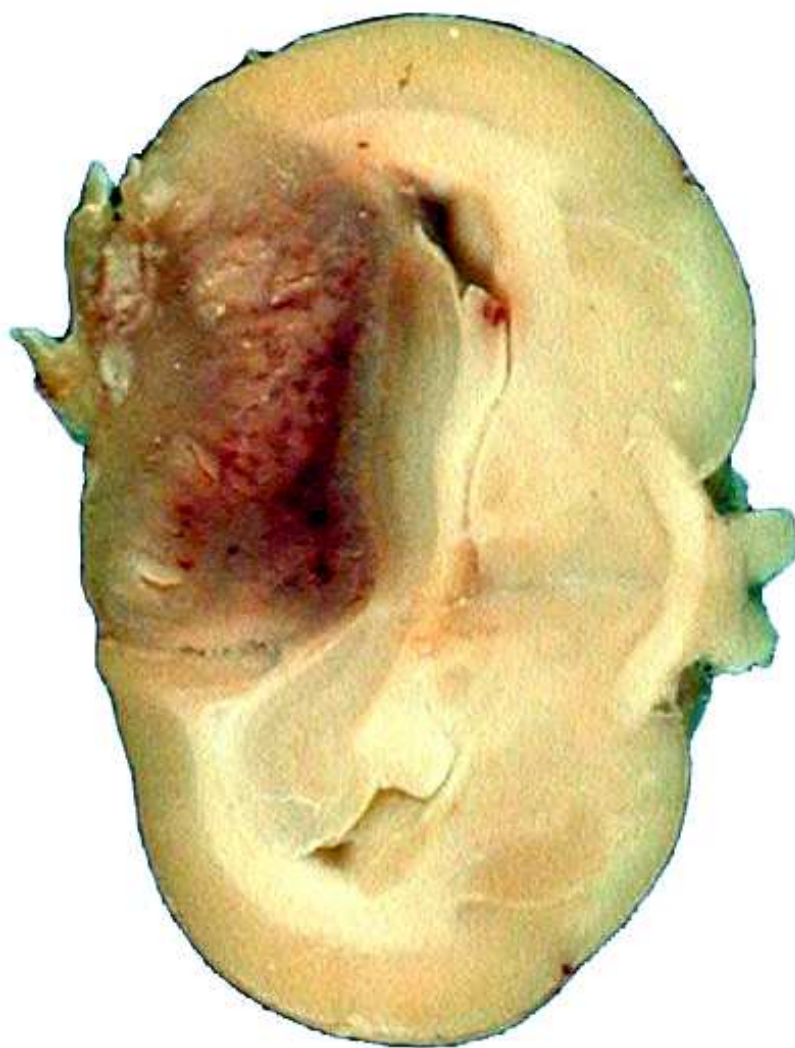


Abb. 9

4.5.2. Ausdehnung, regressive Veränderungen

Bei den Tieren, die einen Tumor entwickelt hatten, fand sich nur in einem Fall in der Kontrollgruppe eine Ausdehnung von drei auf der semiquantitativen Skala von 1 - 5 (s. 3.15). Alle anderen Tiere, sowohl der Mitoxantron- als auch der Kontrollgruppe entwickelten Tumore mit einer Ausdehnung von 4 und 5 auf dieser Skala.

Bei der Auswertung der histologischen Veränderungen fiel auf, daß in der Kontrollgruppe nur eines von 9 Kaninchen eine stärkergradige Blutung zeigte, während in der Mitoxantrongruppe 3 von 6 an ihrem Tumor gestorbenen Tiere (3 haben tumorfrei überlebt) eine mittelschwere und stärkere Blutungen aufwiesen (Abb. 10).

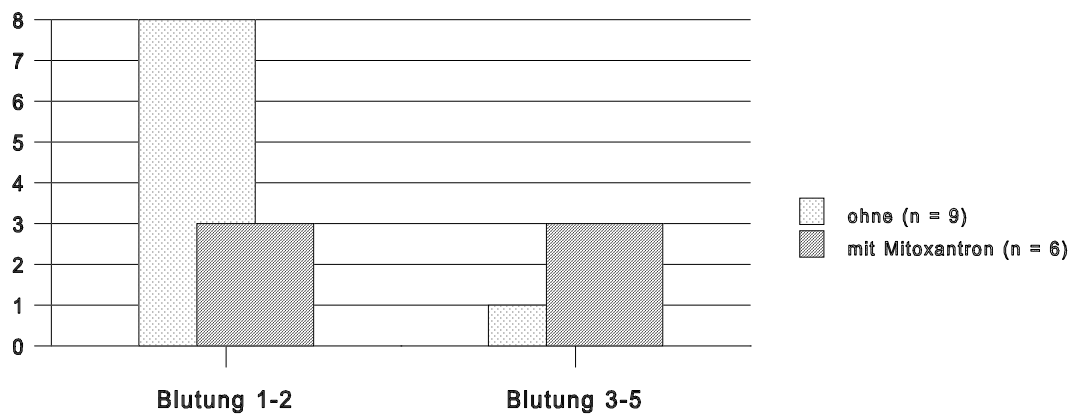


Abb. 10: Histogramm der semiquantitativen Auswertung der Tumorblutungen.

Bei Auswertung der Nekrosen (vgl. Abb. 12) in der Mitoxantrongruppe zeigten 4 von 6 Tieren eine verstärkte Neigung zu umfangreicheren Tumornekrosen. Nur 2 Tiere hatten geringe Nekrosen (Abb. 11). Drei Kaninchen überlebten tumorfrei.

Dem steht in der Kontrollgruppe ein höherer Anteil an Tumoren mit mittlerer Nekrosenneigung gegenüber (Abb. 11).

Abb. 11: Histogramm der semiquantitativen Auswertung der Tumornekrosen

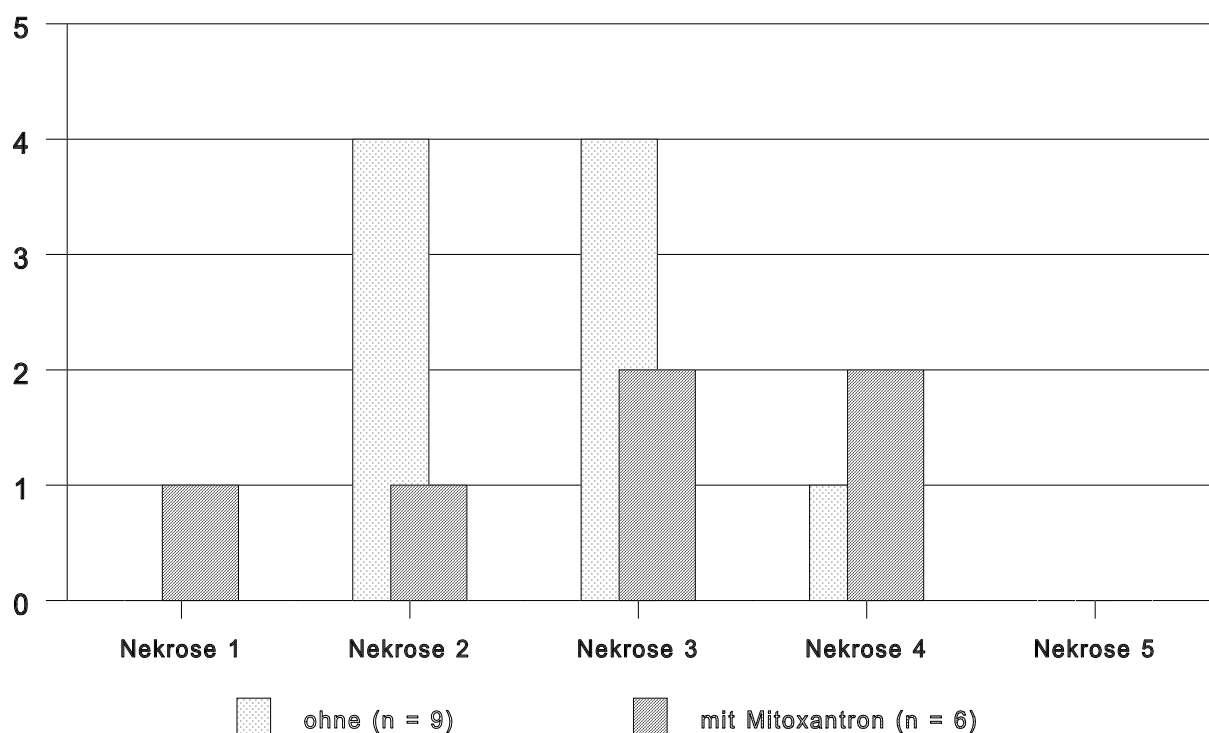


Abb. 12 zeigt das histologische Bild eines Tumorquerschnittes mit ausgedehnter zentraler pseudozystisch umgewandelter Tumornekrose.



Abb. 12

4.5.3 Lokalisation, Infiltration von kontralateraler Hemisphäre, Meningen, Ventrikelsystem oder Knochen.

Alle Tumore befanden sich rechts frontal oder fronto-parietal. Dies entspricht der bei der Implantation der Zellen angestrebten Lokalisation.

Bei 4 von 6 gestorbenen Tieren der Mitoxantrongruppe war der Tumor auf die fronto-parietale Region beschränkt. Bei den beiden anderen Kaninchen reichte der Tumor von frontal bzw. von fronto-parietal bis occipital und erfasste damit drei der fünf Gehirnregionen (Abb. 13).

In der Kontrollgruppe fanden sich in 6 von 9 Fällen Tumore, die auf eine Region beschränkt waren. Bei 2 Tieren dehnte sich der Tumor von frontal bis occipital und in einem Fall von frontal bis parietal aus (Abb.13).

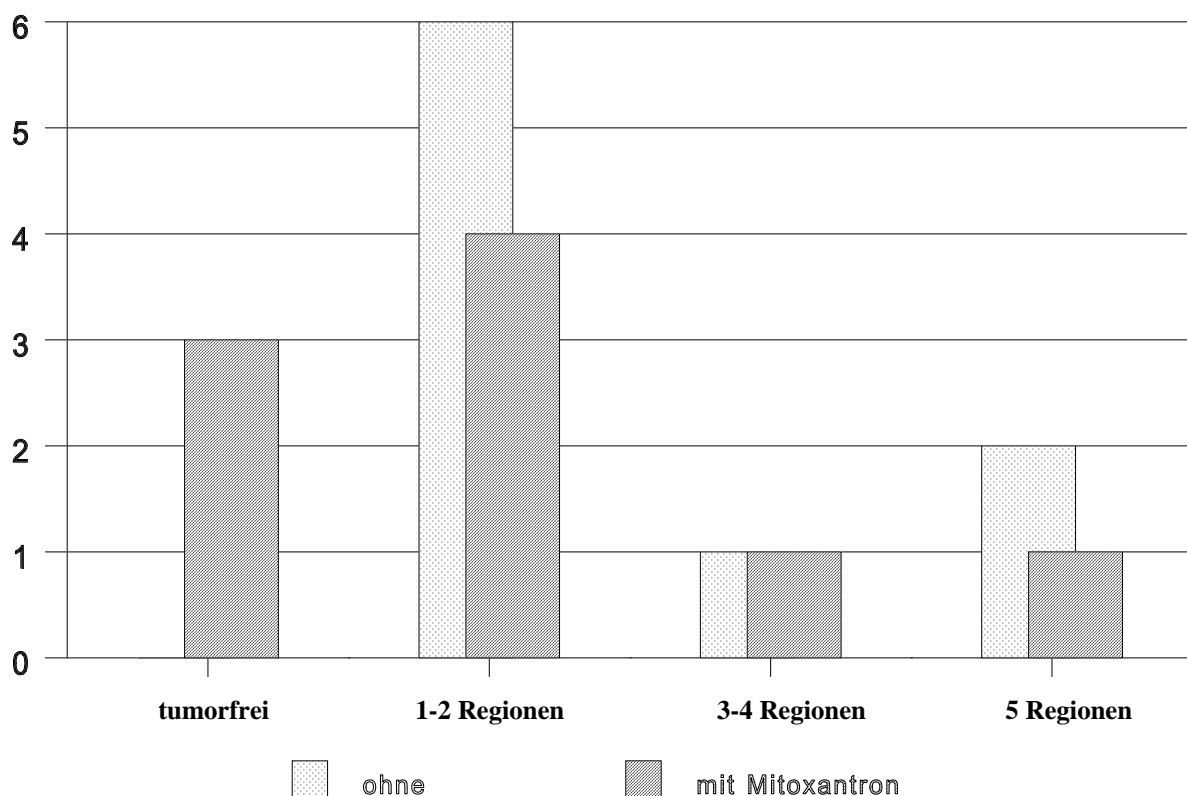


Abb. 13: Histogramm der quantitativen Auswertung der Tumorlokalisationen.

Bei der Auswertung der Infiltration von kontralateraler Hemisphäre, Ventrikel, Meningen und Knochen zeigte sich in der Mitoxantrongruppe bei 3 von 6 Tieren neben der Haupttumormasse, die überwiegend rechts fronto-parietal zu finden war, eine Infiltration der kontralateralen Hemisphäre, bei 3 der 6 Tiere ein Einbruch ins Ventrikelsystem, bei 4 Tieren ein meningealer Befall und in einem Fall eine Arrosion des Schädelknochens (Abb. 14). Drei Kaninchen blieben tumorfrei.

In der Kontrollgruppe fand sich bei 4 von 9 Tieren neben der ebenfalls überwiegend rechts fronto-parietal gelegenen Haupttumormasse eine Infiltration der kontralateralen Hemisphäre, bei 3 Tieren lag ein Einbruch ins Ventrikelsystem vor, 6 der 9 Tiere hatten einen meningealen Befall und bei 2 Kaninchen zeigte sich eine Arrosion des Schädelknochens (Abb. 14).

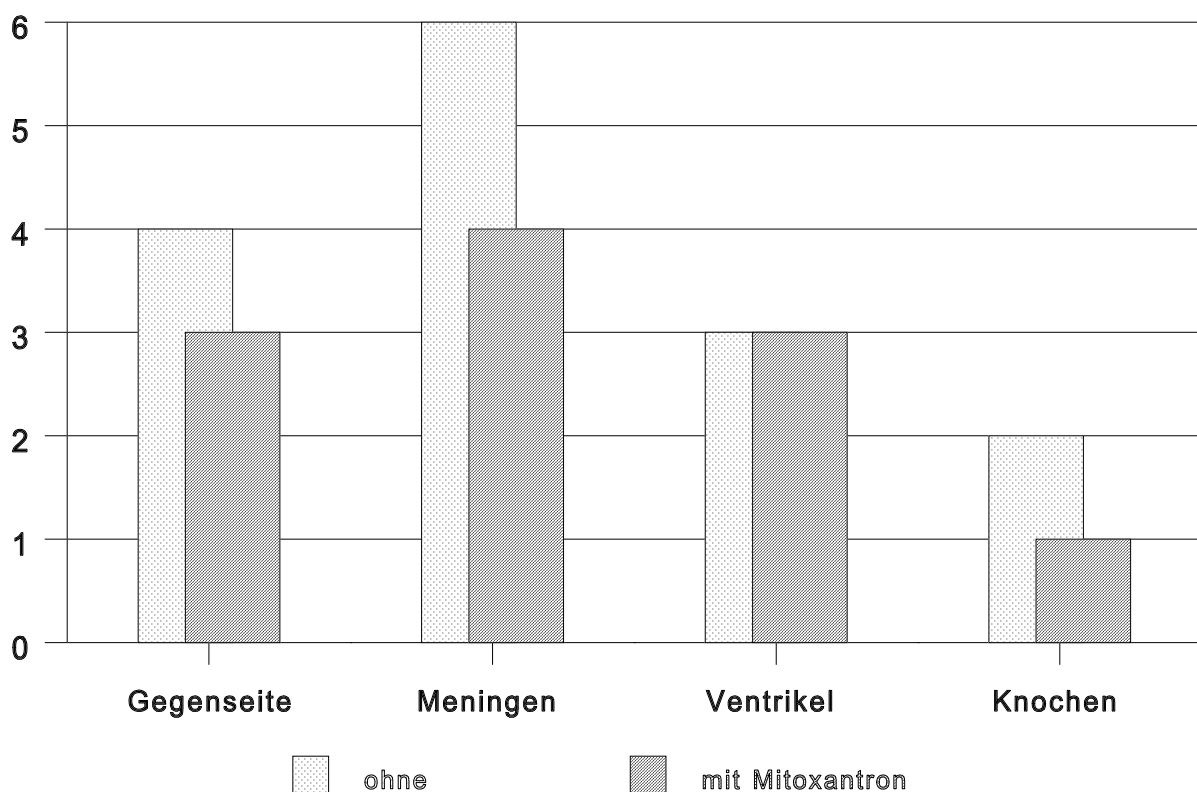


Abb. 14: Histogramm der quantitativen Auswertung der Tumordinfiltration in Nachbarregionen.

4.5.4. Histologischer Vergleich am 26. Tag nach intracerebraler Tumorzellimplantation

In der Gruppe der Kaninchen, die laut Versuchsprotokoll am 26. Tag getötet wurden, fanden sich makroskopisch in allen Fällen im Gehirn nachweisbare Tumore (Tab.8 und 9).

Die Lokalisation reichte von frontal (bei dem Tier der Kontrollgruppe und einem der behandelten Tiere) über frontal bis fronto-parietal bei einem weiteren behandelten Tier bis zu einer Ausbreitung von frontal bis occipital bei dem 4., ebenfalls behandelten Tier.

Die Ausdehnung des Tumors wurde bei dem Tier der Kontrollgruppe semiquantitativ mit 5, bei denen der Mitoxantrongruppe in einem Fall mit 5, in einem mit 3 und in einem mit 2 bewertet.

Bei der Beurteilung der Hämorrhagien fand sich bei dem Tier der Kontrollgruppe und bei 2 der behandelten Kaninchen ein Ausprägungsgrad von 3 auf der semiquantitativen Skala und bei dem dritten Tier der Mitoxantrongruppe eine Ausprägung entsprechend 1.

Nekrosen fanden sich bei dem Tier der Kontrollgruppe und einem der behandelten in einer Ausprägung von 3, bei den 2 übrigen behandelten Tieren in einer Ausprägung von 2 auf der semiquantitativen Skala.

Eine Infiltration des Knochens lag bei dem Tier der Kontrollgruppe (Nr. 79) vor. Bei den Kaninchen der Mitoxantrongruppe fand sich in 2 Fällen eine Infiltration von kontralateraler Hemisphäre, Meningen und Ventrikelsystem und in einem Fall ein Übergreifen des Tumors auf Meningen und Ventrikel.

Es lassen sich also bei den 4 Tieren, die entsprechend dem Versuchsplan am 26. Tag getötet wurden, bis auf ein Tier mit einem sehr ausgedehnten Tumorbefall (Nr. 91), hinsichtlich Lokalisation, Tumorgöße und regressiver Veränderungen keine auffälligen Unterschiede verzeichnen.

Tier	Mit.	Tu.	fro.	f.-p.	par.	p.-o.	occ.	Geg	Men	Ven	Kno
81	X	X	X	X				X	X	X	
83	X	X	X						X	X	
91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
79		X	X								X

Tab. 8: Ergebnisse der histologischen Auswertung von Tumorlokalisation und Tumordinfiltration in Nachbarregionen bei 4 am 26. Versuchstag getöteten Tieren.

Mit.:	Mitoxantron	Tu.:	Tumor	fro.:	frontal
f.-p.:	fronto-parietal	par.:	parietal	p.-o.:	parieto-occipital
occ.:	occipital	Geg:	Gegenseite	Men:	Meningen
Ven:	Ventrikel	Kno:	Knochen		

Tier	Mitoxantron	Ausdehnung	Hämorrhagien	Nekrosen
81	X	XXXXXX	X	XXX
83	X	XX	XXX	XX
91	X	XXX	XXX	XX
79		XXXXXX	XXX	XXX

Tab. 9: Ergebnisse der semiquantitativen histologischen Auswertung der intracerebralen Tumorausdehnung und von regressiven Veränderungen bei 4 am 26. Versuchstag getöteten Tieren.

5. Diskussion

Das Glioblastom (WHO Grad IV) ist der häufigste und bösartigste Hirntumor des Erwachsenen.

Alle Versuche, die Behandlungsergebnisse zu verbessern, haben letztendlich an der infausten Prognose dieses Tumors nichts Wesentliches zu ändern vermocht. Nach wie vor gelten die neurochirurgische Tumoresektion und die postoperative Bestrahlung als Standardtherapie, wobei die mittlere Überlebenszeit nach Symptombeginn oder Operation von 4 - 6 Monaten durch radikale Tumoresektion und Nachbestrahlung lediglich auf 6 - 10 Monate verlängert werden kann (37).

Bisher angewandte Chemotherapieprotokolle konnten die Überlebenszeit der Patienten trotz zum Teil erheblicher Toxizität ebenfalls nur um wenige Wochen verlängern. Allerdings sind unter den so behandelten Patienten vermehrt Langzeitüberlebende zu verzeichnen (44). Auch unter den Patienten mit anaplastischen Astrozytomen WHO Grad III, die zusätzlich zu Operation und Bestrahlung eine Chemotherapie erhielten, finden sich vermehrt Langzeitüberlebende (44). Bisher kam zum Einsatz, daß lipidlöslichen Nitrosoharnstoffe unter der Vorstellung, daß wasserlösliche Medikamente die Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringen können und somit unwirksam seien.

Im normalen menschlichen Gehirn schützt die Blut-Hirn-Schranke das Gehirn vor einer Reihe schädlicher Substanzen. Sie besteht aus den im Zentralnervensystem vorhandenen, lückenlos schließenden, interzellulären Verbindungen des Kapillarendothels, den tight junctions (100). Durch diese Barriere können in der Regel lediglich lipophile, nicht ionisierte Substanzen in das Gehirngewebe gelangen. Für hydrophile Substanzen, die größer sind als Harnstoff, ist die Blut-Hirn-Schranke impermeabel (48). Bisherige größere kontrollierte Studien wurden daher in erster Linie mit den lipidlöslichen Nitrosoharnstoffen durchgeführt.

Walker (90) berichtet von zwei großangelegten, randomisierten Multi-Center-Studien. In der einen Studie mit 252 wegen eines malignen Glioms operierten Patienten wurden ausschließlich optimale pflegerische Maßnahmen ohne weitere Therapie in einem vierarmigen Vergleich alleiniger postoperativer Strahlentherapie und alleiniger postoperativer Chemotherapie mit BCNU einer Kombinationsbehandlung von postoperativer Strahlentherapie und BCNU gegenübergestellt.

Jene Patienten, die im Anschluß an die Operation ohne Therapie blieben, lebten im Mittel noch 14 Wochen.

Alleinige Behandlung mit BCNU verlängerte das mittlere Überleben auf 18,5 Wochen, während die alleinige Strahlentherapie eine Zunahme der mittleren Überlebenszeit auf 35 Wochen bewirken konnte.

Das Ergebnis der Kombination von Strahlentherapie und BCNU war mit einer mittleren Überlebenszeit von 34,5 Wochen in dieser Studie nicht signifikant. Allerdings waren in dieser Gruppe die meisten Langzeitüberlebenden zu verzeichnen. 19% dieser Patienten waren nach 18 Monaten noch am Leben, während bei den anderen Therapiemodalitäten nur 4% der Patienten diesen Zeitraum überlebten.

In der zweiten Studie wurde bei 358 operierten Patienten mit gesichertem malignen Gliom eine Therapie mit alleiniger Strahlentherapie und alleiniger Chemotherapie mit CCNU zwei weiteren Gruppen mit Strahlentherapie in Kombination mit CCNU und Strahlentherapie in Kombination mit BCNU gegenübergestellt.

Mit 24 Wochen mittleren Überlebens bei alleiniger Therapie mit CCNU und 36 Wochen nach alleiniger Strahlentherapie zeigten sich bei diesen beiden Verfahren die schlechtesten Ergebnisse. Die Kombinationsbehandlung Strahlentherapie mit CCNU bewirkte eine Zunahme der mittleren Überlebensspanne auf 42 Wochen und die Kombination von Strahlentherapie und BCNU auf 51 Wochen.

In der Deutsch-Österreichischen Gliomstudie (58) wurden an 501 Patienten mit malignen Gliomen nicht nur die Einflüsse von Radiatio und Chemotherapie auf das postoperative Überleben untersucht, sondern es wurden auch Subgruppenanalysen durchgeführt.

In dieser Studie zeigte sich zum einen, daß die Ganzhirnbestrahlung mit 60 Gy einer Bestrahlung des gesamten Schädels mit 40 Gy und anschließender Tumorbettbestrahlung mit weiteren 20 Gy nicht überlegen ist.

Des weiteren wurde nach Operation und Bestrahlung eine Chemotherapie mit der Monosubstanz BCNU der Kombinationsbehandlung mit BCNU und VM 26 gegenübergestellt.

Insgesamt lebten von den Patienten, die zusätzlich zur Radiatio BCNU als Monosubstanz erhalten hatten, nach 18 Monaten noch 29%, die 2-Jahres-Überlebensrate war 15% und die 5-Jahres-Überlebensrate 6%. Die mediane Überlebenszeit in diesem Therapiearm war 50 Wochen.

In der Gruppe, die zusätzlich zur Radiatio sowohl BCNU als auch VM26 verabreicht bekam, war die mediane Überlebenszeit 53 Wochen, die 18-Monate-Überlebensrate 34%, die 2-Jahres-Überlebensrate 21% und die 5-Jahres-Überlebensrate 12%. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war jedoch statistisch nicht signifikant.

Erfaßt wurden weiterhin in der Subgruppenanalyse die Einflüsse von Alter, Malignitätsgrad und initialem Karnofsky-Index.

Es zeigte sich, daß Patienten mit einem Alter unter 50 Jahren und Patienten mit einem Karnofsky-Index >70% hinsichtlich ihres Überlebens deutlich von einer Kombinationsbehandlung mit BCNU und VM26 profitierten.

Wie zu erwarten, war auch der Malignitätsgrad III mit einem deutlichen Überlebensvorteil gegenüber Grad III - IV und Grad IV verbunden.

Als Schlußfolgerung ergab sich, daß jüngere Patienten mit einem Karnofsky-Index von 70% oder darüber aggressiver behandelt werden sollten, da sie von einer solchen Behandlung deutlich profitieren.

Ein Nachteil der in diesen Studien zur Anwendung gekommenen Nitrosoharnstoffe ist jedoch ihre erhebliche Toxizität. BCNU führt gehäuft zu auch durch regelmäßig durchgeführte Lungenfunktionsprüfungen nicht vorhersagbaren Lungenfibrosen (13, 58). Auf ACNU trifft dies nicht in dem Maße zu (44, 97), jedoch schränken die gastrointestinalen Nebenwirkungen der alkylierenden Substanzen die Lebensqualität der Patienten sehr ein und nur ein Teil von ihnen spricht auf die zusätzliche Therapie an. Die übrigen, zusätzlich zu Operation und Radiatio auch chemotherapierten Patienten erleiden die oben erwähnten Nebenwirkungen, ohne daß es für sie einen Überlebensvorteil brächte.

Es ist daher wünschenswert, bei einer geplanten Chemotherapie eine Substanz zu wählen, die nicht nur wirksam, sondern auch so gut verträglich ist, daß sie für die behandelten Patienten nicht noch eine zusätzliche Verschlechterung ihrer Lebensqualität bedeutet.

Mitoxantron, das bisher bei diversen Tumoren eine gute Wirksamkeit gezeigt hat (23, 62, 68), ist in vitro gegen Hirntumore wirksam (38, 64, 80) und gilt als relativ gut verträglich.

Es handelt sich bei Mitoxantron um ein vollsynthetisches Anthrachinon, das als eine Weiterentwicklung der Anthracycline deren antineoplastische Wirksamkeit besitzt, ohne jedoch die gleiche Kardiotoxizität aufzuweisen. Übelkeit und Erbrechen sind auch in höherer Dosierung nur mäßiggradig ausgeprägt und gut medikamentös beherrschbar, sodaß eine gute subjektive Verträglichkeit gegeben ist. Dosislimitierend ist die Myelosuppression, die in erster Linie als Leukopenie und in zweiter Linie als Thrombozytopenie in Erscheinung tritt (61).

Der genaue Wirkungsmechanismus von Mitoxantron ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird ein Zusammenhang mit der Hemmung der Nukleinsäuresynthese angenommen. Seine Wirkung ist zellzyklusunspezifisch, es interkaliert mit DNS und ruft Quervernetzungen innerhalb und zwischen den DNS-Strängen hervor. Mitoxantron ist ein wirksamer Inhibitor der DNS- und RNS-Synthese und blockiert den Zellzyklus in der G2-Phase mit einer Zunahme an zellulärer RNS und Polyploidie (5).

Wegen seiner guten lokalen Verträglichkeit wurde Mitoxantron intraperitoneal bei Peritonealkarzinose (18) und intrathekal bei Lymphomen mit ZNS-Befall eingesetzt (101). Bei der intrathekalen Gabe traten jedoch zum Teil gravierende neurologische Nebenwirkungen wie schwere Schmerzzustände und Lähmungserscheinungen auf (49).

Mit Erfolg systemisch eingesetzt wurde Mitoxantron bisher bei akuter Leukämie (68), Non-Hodgkin-Lymphomen (23) und metastasiertem Mammakarzinom (62).

Auch in der systemischen Behandlung der rasch chronisch-progredienten multiplen Sklerose als einer entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems wird Mitoxantron vermehrt mit Erfolg eingesetzt (42, 56, 76). Hier entspricht seine Wirkung in erster Linie einer Immunsuppression durch einen inhibierenden Effekt auf B- und T-Lymphozyten, wobei insbesondere die B-Zellantwort nach Mitoxantrongabe in vitro und in vivo langfristig unterdrückt wird (55, 56).

Bisher wurde Mitoxantron klinisch bei Hirntumoren kaum eingesetzt, da es wegen seines hohen Molekulargewichtes von 517,4 Dalton und seiner fehlenden Lipidlöslichkeit die intakte Blut-Hirn-Schranke kaum passieren kann, und man davon ausging, daß es daher bei Hirntumoren nicht wirksam sein könne.

Untersuchungen, die die Schrankengängigkeit von verschiedenen Chemotherapeutika zum Inhalt hatten, zeigten auch, daß Mitoxantron die intakte Blut-Hirn-Schranke in der Tat kaum überwinden kann (84, 85). Jedoch fanden sich bei Gewebespiegelmessungen, die post mortem im Rahmen einer Autopsie bei mit Mitoxantron vorbehandelten Patienten durchgeführt wurden, auch in Hirntumoren und nicht nur bei Tumoren anderer Genese wie Mammakarzinomen und Leberzellkarzinomen potentiell zytotoxische Werte (77). Dies läßt den Schluß zu, daß ein zur Therapie intracranieller Tumore eingesetztes Zytostatikum nicht zwangsläufig Schrankengängigkeit besitzen muß.

In malignen Hirntumoren findet sich eine ausgeprägte Neovaskularisation. Das Endothel der neu gebildeten Kapillaren zeigt morphologisch strukturelle Unterschiede zu den üblicherweise im Zentralnervensystem vorhandenen Gefäßen, wie es elektronenmikroskopisch von Long (50) sichtbar gemacht werden konnte. Die interendothelialen Verbindungen sind im Inneren des Tumors lückenhaft und nicht, wie im übrigen ZNS, fest geschlossen, sodaß eine Blut-Hirn-Schranke hier nicht existiert. Das gleiche Phänomen wurde in Metastasen und experimentell erzeugten Hirntumoren beschrieben (14, 27).

Innerhalb maligner Hirngeschwülste fehlt daher eine funktionstüchtige Blut-Hirn-Schranke fast völlig, wohingegen sie im umliegenden Hirngewebe zumindest teilweise erhalten ist. Für die Effekte zytostatischer Substanzen im Tumor wesentlich sind daher weniger ihre jeweilige Schrankengängigkeit als vielmehr ihre zytotoxische Aktivität.

In Chemosensitivitätsprüfungen, welche in vitro die Ansprechrate von Hirntumoren auf ein bestimmtes Chemotherapeutikum mit einer in vivo Korrelation für ein richtig positives Ergebnis von 69% und für ein richtig negatives Ergebnis von 91% vorhersagen (64), wurde Mitoxantron verschiedenen anderen Chemotherapeutika gegenübergestellt. Im MTT-Test zeigte Mitoxantron eine deutlich tumorizide Wirkung auf die eingesetzten Gliomzellen (38, 64).

In einer weiteren, vergleichenden Untersuchung, in der sowohl im Colony forming assay (CFA) als auch im MTT-Test ACNU, BCNU, Mitomycin C und Mitoxantron einander in ihrer zytotoxischen Wirksamkeit bei malignen Gliomen gegenübergestellt wurden, war Mitoxantron in seiner Sensitivitätsrate in vitro sogar BCNU, dem bisher wirksamsten Nitrosoharnstoff, überlegen (80).

Auch Senkal et al. (70) fanden in biotisch gewonnenen Glioblastomzellen und Astrocytomzellen nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen hohen Dosen Mitoxantron (0, 0,01, 0,1 und 1,0micro-g/ml) eine dosisabhängige lineare Zunahme von DNA-Strangbrüchen bei Mitoxantron -Konzentrationen von 0,01 bis 1,0micro-g/ml, was ebenfalls als Beweis für dessen Wirksamkeit in vitro gewertet werden kann.

Green et al. (25) verabreichten 10 Patienten 5 - 6mg Mitoxantron/m² (dies entspricht der halben üblicherweise applizierten Dosis) intravenös vor geplanter Tumoresektion maligner, intracranieller Tumore. Bei der postoperativ durchgeführten Messung der intratumoralen Gewebespiegel von Mitoxantron fanden sich durchgängig potentiell zytotoxische Werte.

Auch im Tierversuch wurde Mitoxantron in einer der üblichen, therapeutischen Dosis äquivalenten Dosierung weißen Neuseeländer Kaninchen mit einem zuvor experimentell erzeugten, transplantierten Hirntumor intravenös verabreicht und nach anschließender Entnahme der Gehirne Gewebespiegelmessungen durchgeführt. Es zeigten sich intratumoral Werte, die im therapeutischen Bereich für andere, solide Tumore lagen, wohingegen in der kontralateralen Hemisphäre Mitoxantron nicht nachweisbar war (81)

In der vorliegenden Arbeit sollte im Tierversuch an zuvor ins Gehirn von Kaninchen implantierten VX2-Tumoren die chemotherapeutische Wirksamkeit von systemisch verabreichtem Mitoxantron untersucht werden. Weiße Neuseeländer Kaninchen wurden gewählt, da Kaninchen unproblematisch in der Haltung sind und die Gehirne eine Größe haben, die die in vivo-Untersuchung mit bildgebenden Verfahren ermöglicht, welche im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls vorgesehen war.

Das Tumormodell des implantierten VX2-Tumors erschien geeignet, da dieser Tumor in vitro Mitoxantron gegenüber als sensitiv gilt (Unveröffentlichte Ergebnisse einer Konzentrations-Wirkungs-Analyse Prof. Dr. J. Tonn, München). Mitoxantron wurde, äquivalent zur Therapie beim Menschen, in einer Dosis von 14mg/m^2 Körperoberfläche eingesetzt.

5 der 9 im Rahmen dieser Arbeit chemotherapierten Kaninchen starben 25 - 31 Tage nach Tumorzellimplantation, also in einem Zeitraum, der den Erwartungen aus früheren Arbeiten (35, 81) bei unbehandelten Tieren entsprach.

4 der 9 chemotherapierten Tiere jedoch überlebten einen Zeitraum von mehr als 2 Monaten. Nahezu alle Tiere der Kontrollgruppe ($n = 9$) starben in dem erwarteten Zeitraum (22 - 34 Tage), lediglich eines überlebte 45 Tage.

3 der mit Mitoxantron behandelten Tiere zeigten autopsisch 8 Monate nach Tumorzellimplantation gar keinen Tumor und eines war mit einer Überlebenszeit von 72 Tagen eindeutig als langzeitüberlebend einzustufen, obwohl die zu erwartende Überlebenszeit weniger als einen Monat betrug, was sich auch in der Kontrollgruppe bestätigte.

Dies entspricht 44% langzeitüberlebenden Tieren in der Verumgruppe gegenüber 0% in der Kontrollgruppe.

Es ist unwahrscheinlich, daß eine fehlerhafte Injektionstechnik diese positiven Ergebnisse hervorgerufen hat, da das mit 72 Tagen langzeitüberlebende Tier noch einen Tumor entwickelte und daran starb und bei den drei tumorfrei gebliebenen Tieren nach deren Tötung in allen drei Fällen der Stichkanal an der erwarteten Stelle gefunden wurde (Abb.3). Die verwendeten Tumorzellen stammten zudem aus verschiedenen Chargen und von jeder dieser Chargen wurden ebenfalls Zellen zur Implantation bei Versuchstieren der Kontrollgruppe verwandt, die jeweils im erwarteten Zeitraum einen Tumor entwickelten und starben.

Am 12. Tag, dem Tag der Mitoxantron- Applikation, wurden bei allen Tieren craniale Computertomographien durchgeführt. Hier zeigte sich zwar bei keinem Tier ein manifester Tumor, jedoch liegt die Nachweisgrenze der CT bei einer Mindestgröße des Tumors von 1 - 2 cm.

In den cranialen Computertomographien, die eine Woche später durchgeführt wurden, zeigten sich in insgesamt 7 Fällen manifeste Tumore, jedoch war kein Unterschied in der nachgewiesenen Tumorgroße zwischen behandelten und unbehandelten Tieren zu finden. Zwar waren alle drei Tiere der Mitoxantrongruppe, die später tumorfrei blieben, in der CT negativ, jedoch starben 4 Tiere mit eindeutig negativem computertomographischen Untersuchungsergebnis und die 3 Tiere mit fraglich positivem Ergebnis jeweils an ihren Tumoren. Regelmäßige Computertomographien haben sich daher in dieser tierexperimentellen Arbeit nicht als zuverlässiges, prognostisches Kriterium, sondern nur als zusätzlicher Risikofaktor wegen der dazu notwendigen Narkose erwiesen. Die relativ geringe Größe der Versuchstiere und die daraus resultierende geringe Tumorgroße lassen eine CT-Überwachung daher für weitere Versuche mit diesem Tumormodell als wenig sinnvoll erscheinen.

Der 12. Tag nach Implantation als Zeitpunkt für die erste CT und die Mitoxantron-Gabe wurde gewählt, da aus früheren Arbeiten (35, 81) bekannt war, daß nach Implantation von VX2-Tumorzellen unter den gleichen Bedingungen wie in dieser Arbeit die unbehandelten Tiere nach circa 26 Tagen sterben.

Es konnte damit gewährleistet werden, daß genügend Zeit für das ungestörte Tumorstadium zur Verfügung stand und andererseits Mitoxantron ausreichend lange vor dem spontanen, tumorbedingten Tod der Versuchstiere seine zu prüfende Wirksamkeit entfalten konnte.

Die fronto- parietale Region als Implantationsstelle wurde ausgewählt, da hier bei Kaninchen weder lebenswichtige Strukturen betroffen werden, noch eine versehentliche Injektion ins Ventrikelsystem zu erwarten war (93), was ebenfalls einen früheren Tod der Tiere oder eine schlechtere Vergleichbarkeit der Ergebnisse verursacht hätte.

Die wesentlicheren Symptome, die dem Tod der Tiere vorausgingen, entsprachen den erwarteten motorischen Ausfällen, bestanden vor allem aber in einer deutlichen Hirndrucksymptomatik.

Um zusätzlich zu den Überlebensdaten und der histologischen Bewertung der Gehirne spontan gestorbener Tiere noch einen direkten Vergleich bezüglich Tumorgroße und histologischer Parameter an einem definierten Tag zu ermöglichen, wurden 4 Tiere am 26. Tag getötet.

Eines der Tiere gehörte der Kontroll-, die übrigen der Verumgruppe an. Es ließen sich hier bis auf die Befunde bei einem Tier mit einem sehr ausgedehnten Tumorbefall hinsichtlich

Lokalisation, Tumorgröße und regressiver Veränderungen keine auffälligen Unterschiede verzeichnen.

Des weiteren wurden Lunge und Leber der Tiere auf Fernmetastasen untersucht. Daß bei keinem Tier eine extrakranielle Metastasierung zu finden war, kann dadurch zu erklären sein, daß die Tiere nicht lange genug lebten, um eventuelle Metastasen manifest werden zu lassen. Andererseits bestätigt sich die allgemeine Erfahrung, daß eine extrakranielle Metastasierung intracerebraler Tumoren auch beim Menschen nur sehr selten vorkommt.

Bei den Tieren, die letztlich einen Hirntumor entwickelten, unterschied sich makroskopisch die Tumorgröße im wesentlichen nicht zwischen den Tieren der Kontroll- und der Verumgruppe. Die mittlere, an der Gehirnoberfläche messbare Tumoroberfläche war bei den Tieren der Verumgruppe 1,48cm² und bei den Tieren der Kontrollgruppe 1,45cm².

Ein gravierender Unterschied war allerdings bei den spontan verstorbenen Tieren auch nicht zu erwarten, da die Tiere bei Überschreiten einer kritischen Tumorgröße an diesem Tumor - meist in Folge des Hirndruckes - sterben.

Auch in der histologischen Aufarbeitung der post mortem entnommenen Kaninchengehirne zeigten sich, wie auch schon makroskopisch, bei der Tumorausdehnung keine größeren Unterschiede.

Bei den regressiven Veränderungen fand sich sowohl beim Vergleich der Nekrosen als auch beim Vergleich der Blutungen ein leichter Unterschied in der Form, daß behandelte Tiere ausgeprägtere regressive Veränderungen zeigten als unbehandelte Tiere.

Als wesentlichstes Resultat dieser tierexperimentellen Untersuchungen bleibt demnach festzuhalten, daß durch Mitoxantronbehandlung von Kaninchen mit einem intracerebralen VX2 -Implantattumor in knapp der Hälfte der Versuchstiere eine wesentliche und statistisch signifikante Lebensverlängerung erreicht werden konnte ($p < 0,05$).

Beim Menschen liegen bisher nur wenig Erfahrungen mit dem Einsatz von Mitoxantron bei intracraniellen Tumoren vor.

In einer Phase-2-Studie (78) wurden 16 Patienten mit Astrocytomen Grad III - IV, von denen jedoch 12 mit anderen Medikamenten vorbehandelt waren und nicht oder nicht mehr auf diese Therapie angesprochen hatten, mit Mitoxantron in einer Dosierung von 16 mg/m² alle 3 Wochen behandelt. 14 der 16 Patienten waren vorbestrahlt. Lediglich einer der Patienten sprach für einen Zeitraum von 10 Wochen auf die Chemotherapie mit Mitoxantron an. Es handelte sich jedoch um einen der beiden Patienten, die bis dahin außer dem primär chirurgischen Eingriff keine weitere Vorbehandlung erfahren hatten. Im CT hatte sich bei diesem Patienten im Anschluß an die Operation noch ein großer Residualtumor gezeigt.

In einer weiteren klinischen Phase-1-2-Studie (7) wurde Mitoxantron bei Rezidiven maligner Gliome bei 9 Patienten mit Glioblastom und 3 Patienten mit anaplastischen Astrozytomen interstitiell über ein Ommaya-Reservoir verabreicht. Vor Auftreten des Tumorrezidivs waren alle 12 Patienten nach einem Protokoll, das eine Schädelbestrahlung sowie eine Chemotherapie mit Cisplatin und BCNU einschloß, vorbehandelt worden.

Zur Behandlung des Rezidivs erhielten 8 der Patienten gleichzeitig zu der interstitiellen Mitoxantron-Gabe eine systemische Chemotherapie mit PCV und Mitoxantron, 4 Patienten wurden bis zu einem erneuten Progress ausschließlich lokal behandelt.

In 5 Fällen der 8 kombiniert behandelten Patienten war ein Rückgang des Tumors oder zumindest eine Stabilisierung für drei bis 9 Monate zu erreichen. Die Überlebenszeit war 6 - 12 Monate nach Auftreten des Progresses.

Bei den 4 Patienten, deren Rezidiv vorerst ausschließlich lokal behandelt wurde, war der Zeitraum bis zu einem erneuten Progress 4,5 - 9,5 Monate. Nach Eintreten des erneuten Progresses wurden sie systemisch mit PCV chemotherapiert. Die Überlebenszeit nach Auftreten des ersten Progresses variierte von 9,5 - 11 Monaten.

Wegen der zusätzlichen Gabe von PCV war es nicht möglich, die alleinige Effizienz von Mitoxantron zu erfassen, jedoch wurden die Ergebnisse der Untersuchung als ermutigend eingeschätzt und weitere Phase-2-Studien mit Mitoxantron empfohlen.

Diese Ergebnisse lassen insgesamt den Schluß zu, daß eine antitumorale Wirksamkeit von Mitoxantron auch bei Hirntumoren nicht nur in vitro, sondern, bei deutlich besserer Verträglichkeit gegenüber den bisher überwiegend eingesetzten Nitrosoharnstoffen, auf Grund der im Tumor gestörten Blut-Hirn-Schranke, auch in vivo erwartet werden kann.

Zudem wurden in der Deutsch-Österreichischen Gliomstudie (58) zusätzlich zu den Einflüssen verschiedener Parameter auf die Überlebenszeit der Patienten auch Daten bezüglich der Überlebensqualität unter OP, Radiatio und Chemotherapie anhand der ACSA- (Anamnestic Comparative Self Assessment) Skala erhoben. Auf einer visuellen Analogskala schätzte der Patient sein derzeitiges Gesamtbefinden zwischen +5 = schönste Zeit seines Lebens und -5 = schlechteste Zeit seines Lebens ein. Von den befragten Patienten wurde die subjektive Lebensqualität trotz der mit der Therapie verbundenen Nebenwirkungen durchweg als positiv beurteilt.

Es scheint daher vertretbar, jüngere Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom WHO Grad III oder einem Glioblastom WHO Grad IV bei gutem Karnofsky-Index einer entsprechenden Chemotherapie zuzuführen, da gerade sie von einer solchen Behandlung profitieren und in der Gruppe der chemotherapeutisch behandelten Patienten vermehrt Langzeitüberlebende zu verzeichnen sind.

Wird eine Therapie angestrebt, die bei sicher nur palliativer Zielsetzung die Lebensqualität der Patienten nicht zusätzlich einschränkt, wie es ja bei den bisher überwiegend angewandten Nitrosoharnstoffderivaten eher fast die Regel ist, erscheinen weitere Untersuchungen zur möglichen Eignung von Mitoxantron in der adjuvanten Chemotherapie maligner Gliome durchaus gerechtfertigt.

6. Zusammenfassung

Obgleich die Überlebenszeiten von Patienten mit einem malignen Gliom durch multimodale Therapieformen in den letzten Jahren geringfügig verlängert werden konnten, ist die Prognose dieses Tumors leider nach wie vor infaust. Neben der postoperativen Bestrahlung kommt aber auch bei malignen Gliomen eine adjuvante Chemotherapie mit verschiedenen Medikamenten in Betracht.

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Eignung von Mitoxantron in der adjuvanten Therapie von malignen Gliomen im Tiermodell zu überprüfen, da dieses Zytostatikum in vitro eine hohe Wirksamkeit gegen Tumorzellen maligner Gliome zeigt.

An 18 Kaninchen wurden daher, nach zuvor experimentell erzeugtem VX2-Implantattumor, eventuelle Überlebensvorteile behandelter (n=9) gegenüber unbehandelten (n=9) Tieren untersucht sowie mögliche Unterschiede bezüglich Tumorgroße, -ausdehnung und regressiver Veränderungen überprüft. Zusätzlich wurden CT-Screenings vorgenommen und das eventuelle Vorliegen von Fernmetastasen in Lunge oder Leber der Tiere untersucht. Außerdem wurden bei weiteren 4 Tieren ein histologischer Direktvergleich gefundener Tumore nach Tötung am 26. Versuchstag durchgeführt.

Im Vergleich der Überlebenszeiten der im Spontanverlauf der Tumorerkrankung beobachteten und der behandelten Tiere zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$): 4 der 9 chemotherapierten Tiere überlebten einen Zeitraum von mehr als 2 Monaten, wobei 3 der Tiere, bei nachgewiesenem Stichkanal der Tumorzellimplantation, autopsisch nach 8 Monaten gar keinen Tumor zeigten und eines mit einer Überlebenszeit von 72 Tagen als langzeitüberlebend einzustufen ist. Die übrigen 5 der 9 im Rahmen dieser Arbeit chemotherapierten Kaninchen starben in einem Zeitraum, der dem der unbehandelten Tiere entsprach. Dies entspricht einem Prozentsatz von Langzeitüberlebenden in der Verumgruppe von 44% gegenüber 0% in der Kontrollgruppe.

Die CT-Untersuchung erwies sich wegen Unterschreitung der Tumor-Nachweisgrenze, die bei einer Mindesttumorgröße von 1 - 2 cm liegt nicht als geeignete Methode, um Aussagen bezüglich zeitlicher Unterschiede in der Tumormanifestation behandelter und unbehandelter Tiere machen zu können.

Autoptisch waren Unterschiede bezüglich Tumorgröße- und ausdehnung behandelter und unbehandelter Tiere, bei denen der Spontanverlauf abgewartet wurde, nicht nachweisbar.

Fernmetastasen konnten in keinem Fall gefunden werden.

Als wesentlichstes Resultat der durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß ein zur Behandlung maligner Gliome eingesetztes Zytostatikum zur Erzielung eines antitumoralen Effektes nicht notwendigerweise Schrankengängigkeit gegenüber der Blut-Hirn-Schranke besitzen muß. Aus diesem Grund erscheint es gerechtfertigt, das durch seine geringe Toxizität die Lebensqualität der Patienten nicht noch zusätzlich einschränkende Mitoxantron in die adjuvante Chemotherapie maligner Gliome zu integrieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Abaza M.S., Narayan R.K., Atassi M.Z.(1997). In vitro efficiency of anti-glial fibrillary acidic protein monoclonal antibodies against human malignant glioma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 88: 1094-1099.
2. Ammirati M., Vick N., Liao Y., Ciric J., Mikkael M.(1987). Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery* 21: 201-206.
3. Baldwin N. G., Rice C.D., Tuttle T.M., Bear H.D., Hirsch J.I., Merchant R.E.(1997). Ex vivo expansion of tumor-draining lymph node cells using compounds which activate intracellular signal transduction. I. Characterization and in vivo anti-tumor activity of glioma-sensitized lymphocytes. *J Neurooncol* 32: 19-28.
4. Bashir R., Hochberg F.H., Linggood R.M., Hottelman K.(1988). Pre-irradiation internal carotid artery BCNU in treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 68: 917-919.
5. Bioscience Communications Inc.:Mode of action, 1-12.(1988). Novantrone (mitoxantrone) product monograph, Lederle International (ed), Lederle International, New York.
6. Bloom H.J.G.(1983). New Approaches to the Treatment of High Grade Intracranial Gliomas. In: Krauseneck P. Mertens H.G. ,Therapie maligner Neoplasien des Gehirns. Perimed Erlangen: 68-81.
7. Boiardi A., Salmaggi A., Pozzi A., Broggi G., Silvani A.(1996). Interstitial chemotherapy with mitoxantrone in recurrent malignant glioma: preliminary data. *Journal of Neuro-Oncology* 27: 157-162.
8. Brandes A.A., Scelzi E., Zampieri P., Rigon A., Rotilio A., Amista P., Berti F., Fiorentino M.V.(1997). Phase 2 trial with BCNU plus alpha-interferon in patients with recurrent high-grade gliomas. *Am J Clin Oncol* 20: 364-367.
9. Brem H., Mahaley M.S. Jr., Vick N.A., Black K.L., Schold S.C. Jr., Burger P.C., Friedman A.H., Ciric I. S., Eller T. W., Cozzens J.W., et al(1991). Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment of recurrent gliomas. *J Neurosurg*, 74: 44-446.
10. Burger P.C., Mahaley M.S., Dudka L., Vogel F.S.(1979). The morphologic effects of radiation administered therapeutically for intracranial gliomas. *Cancer*44: 1256-1272.
11. Carabell S.C., Bruno L.A., Weinstein A.S., Richter M.P., Chang C.H.(1981). Misonidazole and radiotherapy to treat malignant glioma: a phase 2 trial of the radiation therapy oncology group. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 7: 71-77.

12. Chang C.H.(1977). Hyperbaric oxygen and radiation therapy in the management of glioblastoma. In: Modern concepts in brain tumour therapy: laboratory and clinical investigations. National Cancer Institute Monograph No 46; U.S. Govt. Printing Office, Washington: 163-169.
13. Colvin M., Chabner B.A.(1990). Alkylating Agents. In: Chabner B.A., Collins J.M.: Cancer Chemotherapy Principles and Practice. J. B. Lippincott Company, Philadelphia: 276-313.
14. Cox D., Pilkington G., Lantos P.(1976). The fine structure of blood vessels in ethylnitrosourea-induced tumors of the rat nervous system. With special reference to the breakdown of the blood-brain barrier. Br J Exp Pathol 57: 419-430.
15. Dan M.D., Maiti P.K., He X., Gillespie G.Y., Halliday W.C., Prashar A.K., Friesen A.D., Kaplan H.A.(1997). Immunoreactivity of human Mab BT 32/A6 with neuroepithelial tumors. J Neurooncol 35: 93-100.
16. De Wys W.D., Fowler E.H.(1973). Report of vasculitis and blindness after intracarotid injection of BCNU in dogs. Cancer Chemother Rep 57: 33-40.
17. Easty D.M., Easty G.C.(1982). Establishment of an in vitro cell line from the rabbit VX2 carcinoma. Virchows Arch (Cell Pathol) 39: 333-337.
18. Ehninger G., Aapro M., Mjaaland I., Rainer H.(1987). Mitoxantron - Pharmakokinetische Untersuchungen bei Phase 1/2 Studien. in: FAC Fortschritte der antimikrobiellen und antineoplastischen Chemotherapie, Band 6-9: 1365-1370.
19. Fadul C., Wood J., Thaler H., Galicich J., Patterson R.H., Posner J.B.(1988). Morbidity and mortality of craniotomy for excision of supratentorial gliomas. Neurology 38: 1374-1379.
20. Frank J.A., Girton M., Dwyer A.J., Cohen P.J., Knop R.H., Diggs R., Cobb J., Doppman J.L.(1987). A reproducible model of metastatic brain and ocular tumor by hematogenous inoculation of the VX2 tumor in rabbits. J Neurosurg 67: 106 -109.
21. Frank J.A., Girton M., Dwyer A.J. Cohen P.J., Lightman S., Gansow O.A., Brechbiel M.W., Doppman J.L.(1987). Ocular and cerebral metastases in the VX2 rabbit tumor model: contrast - enhanced MR imaging. Radiology 164: 527-530.
22. Frank J.A., Girton M., Dwyer A.J., Wright D.C., Cohen P.J., Doppman J.L.(1988). Meningeal carcinomatosis in the VX2 rabbit tumor model: Detection with GD- DTPA enhanced MR imaging. Radiology 167: 825-829.
23. Gams R.A., Kelley J.W., Colomb H.M., Steinberg J., Dukart G.(1983). Mitoxantrone in malignant lymphomas. Cancer Treat Rev 10: 69-72.
24. Georges E., Breitburd F., Jibard N., Orth G.(1985). Two Shope Papillomavirus-associated VX2 Carcinoma cell lines with different levels of keratinocyte differentiation and transplantability. J Virol 55: 246-250.

25. Green R.M., Stewart D.J., Hugenholtz H., Richard M.T., Thibault M., Montpetit V.(1988). Human central nervous system and plasma pharmacology of mitoxantrone. *Journal of Neuro-Oncology* 6: 75-83.
26. Greenberg H.S., Ensminger W.D., Chandler W.F., Layton P., Junck L., Knake J., Vine A.K.(1984). Intra-arterial BCNU chemotherapy for treatment of malignant gliomas of the central nervous system. *J Neurosurg* 61: 423-429.
27. Greig N., Jones H., Cavanagh J.(1983). Blood-brain-barrier integrity and host responses in experimental metastatic brain tumors. *Clin Exp Metast* 1:229-246.
28. Grossman S.A.(1991). Chemotherapy of brain tumors. In: Salzman B. *Neurobiology of Brain Tumors*. Williams & Wilkins, Baltimore: 320 -340.
29. Harsh IV G.R., Leibel S.A., Basbaro N.M., Gutin P.H.(1990). Brachytherapy: interstitial and intracavitary irradiation of brain tumors. In: Youmans J.R.: *Neurological Surgery*, 3. Aufl., WB Saunders, Philadelphia: 3438-3446
30. Hildebrand J.(1985). Chemotherapy of malignant supratentorial gliomas in adults: a ten Years experience of the EORTC Brain Tumor Group. In: Voth D., Krauseneck P.: *Chemotherapy of Gliomas*. W de Gruyter, Berlin: 317-320.
31. Hochberg F., Prados M., Russell C., Weissman D., Evans R., Cook P., Burton G., Eisenberg P.D., Valenzuela R., Verkh L.(1997). Treatment of recurrent malignant glioma with BCNU-fluosol and oxygen inhalation. A phase 1-2 study. *J Neurooncol*, 32: 45-55.
32. Hochberg F.H., Pruitt A.A., Beck D.O., De Brun G., Davis K.(1985). The rationale and methodology for intraarterial chemotherapy with BCNU as treatment for glioblastoma. *J Neurosurg* 63: 876-880.
33. Hohwieler M.L., Lo T.M.C., Silverman M.L., Freidberg S.R.(1986). Brain necrosis after radiotherapy for primary intracerebral tumor. *Neurosurgery* 18: 67-74.
34. Ilsen H.W., Heiss W.D.(1985). Retrospective study on the effect of CCNU and radiotherapy in 44 patients with malignant glioma. In: Voth D., Krauseneck P.: *Chemotherapy of gliomas*. W de Gruyter, Berlin: 373-379.
35. Iwamoto K.S., Cochran S.T., Winter J., Holburt E., Higashida R.T., Norman A.(1987). Radiation dose enhancement therapy with iodine in rabbit VX2 brain tumors. *Radiother Oncol* 8: 161-170.
36. Jellinger K.(1983). Histologische Klassifikation und therapiebedingte Veränderungen. In: Krauseneck P. Mertens H.G. *Therapie maligner Neoplasien des Gehirns*. Perimed Erlangen: 15-25.

37. Jellinger K., Volc D., Podreka I., Grisold W., Flament H., Vollmer R., Weiss R.(1981). Ergebnisse der Kombinationsbehandlung maligner Gliome - Vergleich postoperativer Strahlen-, Polychemo-, sowie kombinierter Strahlen- und Polychemotherapie. *Nervenarzt* 52: 41-50.
38. Jordan J.P., Hand M., Markowitz R.S., Black P.(1992). Test for chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas: use of colorimetric MTT assay. *Journal of Neuro-Oncology* 14: 19-35.
39. Kapp J., Vance R., Parker J.L., Smith R.R.(1982). Limitations of high-dose intra-arterial BCNU chemotherapy for malignant gliomas. *Neurosurgery* 10: 715-719.
40. Kleihues P., Kiessling M., Wiestler O.D.(1997). Tumoren des Nervensystems. In: Böcker W., Denk H., Heitz P.U.(Hrsg.): *Pathologie*. Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore: 299-314.
41. Kleinschmidt-De Masters B.K(1982). Intracarotid BCNU leukencephalopathy. *Cancer* 57: 715-719.
42. Koehler J., Beer K., Pette M.(1998). Mitoxantron-Therapie bei multipler Sklerose. *Aktuelle Neurologie* 25: 262-264.
43. Kornblith P.L., Walker M.(1988). Chemotherapy for malignant gliomas. *J Neurosurg* 68: 1-17.
44. Krauseneck P.(1998). Neuroonkologie. *Aktuelle Neurologie* 25: 219-226.
45. Krauseneck P., Mertens H.G.(1983). Therapie maligner Neoplasien des Gehirns. *Perimed Erlangen*:29.
46. Krauseneck P., Mertens H.G., Richter E., Schmidt M., Halves E., Bogdahn U., Kappos L., Seybold D.(1985). Combined chemotherapy of inoperable and operable malignant gliomas. In: Voth D., Krauseneck P.: *Chemotherapy of Gliomas*. W de Gruyter, Berlin: 353-359.
47. Kruse C.A., Cepeda L., Owens B., Johnson S.D., Stears J., Lillehei K.O.(1997). Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 45: 77-87.
48. Kurz H., Neumann H.-G., Wollenberg P., Forth W., Henschler D., Rummel W.(1987). Allgemeine Pharmakologie In: Forth W., Henschler D., Rummel W.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich: 22.
49. Lakhani A.K., Zuiable A.G., Pollard C.M., Milne A., Treleaven J., Powles R.L.(1986). Paraplegia after intrathecal mitozantrone. *The Lancet*, December 13: 1393.
50. Long D.(1970). Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *J Neurosurg* 32: 127-144.

51. Madajewicz S., West C.R., Park H.C., Ghoola Y., Avellanosa A.M., Tahita H.(1981). Phase-2-Study - intraarterial BCNU therapy for metastatic brain tumors. *Cancer* 47: 653-657.
52. Mahaley M.S.(1991). Neuro - oncology index and review. *J Neuro-Oncol* 11: 85-148.
53. Mahaley M.S. Jr., Bertsch L., Cush S., Gillespie- G.Y.(1988). Systemic gamma-interferon therapy for recurrent gliomas. *J-Neurosurg* 69: 826-829.
54. Marks, J.E.(1991). Ionizing radiation. In: Salzman B., *Neurobiology of Brain Tumors*. Williams & Wilkins, Baltimore: 299-320.
55. Martin R., Hohlfeld R.(1998). Multiple Sklerose. In: Brandt T., Dichgans J., Diener H.C.: *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*. Kohlhammer Verlag, Stuttgart, 3. Auflage: 508-535.
56. Mauch E., Kornhuber H.H.(1993). Die immunsuppressive Therapie der multiplen Sklerose mit Mitoxantron. *Fortschritte der Neurologie - Psychiatrie* 61: 410-417.
57. Meier D. H.(1988). In-vitro-Sensitivität primärer Hirntumoren gegenüber Interferon Alpha, Beta und Gamma. In: Bamberg M., Sack H.: *Therapie primärer Hirntumore*, Zuckschwerdt-Verlag: 39-43.
58. Mertens H.G., Krauseneck P., Köpke W., Messerer D., Aydemir Ü., Kleihues P., Wiestler O.D.(1991). Postoperative Strahlen- und Chemotherapie mit BCNU und VM26 bei malignen supratentoriellen Gliomen des Erwachsenenalters. Abschlußbericht der Deutsch-Österreichischen Gliomstudie, Würzburg.
59. Mills P., Buonomo C., Pillai R.P., Samphilipo Strandberg J. D., Anderson J.H.(1988). In vivo and in vitro ³¹P-NMR preliminary studies of the VX2 carcinoma in rabbits. *Invest Radiol* 23: 584-591.
60. Mine H. Nakamura T.(1983). Mode of lymph node metastases in esophageal cancer induced in rabbits with VX2 carcinoma. *Jpn J Surg* 13: 236-245.
61. Myers C.E.Jr., Chabner B.A.(1990). Anthracyclines. In: Chabner B.A., Collins J.M.: *Cancer Chemotherapy Principles and Practice*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia:357-381.
62. Neidhart J., Goehnour D., Roach R.W., Steinberg J., Young D.(1983). Mitoxantrone versus doxorubicin in advanced breast cancer: a randomized cross-over trial. *Cancer Treat Rev* 10: 41-46.
63. Nelson D.F., Schoenfeld D., Weinstein A.S., Nelson J.S., Wassermann T., Goodman R.L., Carabell S.(1983). A randomized comparison of misonidazole sensitized radiotherapy plus BCNU and radiotherapy plus BCNU for treatment of malignant glioma after surgery. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 9: 1143-1151.

64. Nikkhah G., Tonn J.C., Hoffmann O., Kraemer H.-P., Darling J.L., Schönmayr R., Schachenmayr W.(1992). The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. *Journal of Neuro- Oncology* 13: 1-11.
65. Papavero L., Roosen N., Kiwit J.W.C., Jaschke H., Schirmer M., Lins E., Bock W.J.(1988). Chemotherapie der malignen Gliome mit ACNU: Ein Erfahrungsbericht über 260 intraarterielle Infusionen. In: Bamberg M., Sack H. (Hrsg.), *Therapie primärer Hirntumoren*, Zuckschwerdt Verlag München: 454-457.
66. Parker R.G., Berry H.C., Gerdes A.J., Soronen M.D., Shaw C.M.(1976). Fast neutron beam radiotherapy of glioblastoma multiforme. *Am. J. Roentgenol* 127: 331-335.
67. Pozza F., Colombo F., Marchetti C., Chierego G.(1991). Stereotactic external radiotherapy for gliomas: Techniques, Dosimetry, Results. In: Karim A.B.M.F., Laws E.R. jr: *Glioma*. Springer, Heidelberg-Berlin: 139-152
68. Prentice H.G., Robbins G., Ma D.D.F., Ho A.D.(1983). Sequential studies on the role of mitoxantrone in the treatment of acute leucemia. *Cancer Treat Report* 10: 57-65.
69. Rajkumar S.V., Buckner J.C., Schomberg P.J., Cascino T.L., Burch P.A., Dinapoli R.P.(1998). Phase 1 evaluation of radiation combined with recombinant interferon alpha-2a and BCNU for patients with high-grade glioma. *Int-J-Radiat-Oncol-Biol-Phys.* 40: 297-302.
70. Senkal M., Tonn J.C., Schönmayr R., Schachenmayr W., Eickhoff U., Kemen M., Kollig E.(1997). Mitoxantrone-induced DNA strand breaks in cell-cultures of malignant human astrocytoma and glioblastoma tumors. *Journal of Neuro-Oncology* 32: 203-208.
71. Shapiro, W.R.(1982).Treatment of neuroectodermal brain tumors. *Ann Neurol* 12: 231-237.
72. Shapiro W.R., Green S.B., Burger P.C., Mahaley M.S. jr, Selker R.G., van Gilder J.C., Robertson J.T.(1989). Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. *J Neurosurg* 71: 1-9.
73. Shapiro W.R., Green S.B., Burger P.C., Selker R.G., Mahaley M.S. jr, Mealey J., Robertson J.T.(1991). Recent clinical results in the chemotherapy of brain tumors: BTCCG studies. In: Paoletti P., Takakura K., Walker M.D., Butti G., Pezzotta S.. *Neuro-Oncology*. Kluwer Publ., Dordrecht: 147-152.
74. Shapiro W.R., Shapiro J.R.(1986). Current approaches to chemotherapy. In: Walker M.D. Thomas D.G.T.: *Biology of Brain Tumour*. Martinus Nijhoff, Boston: 383-392.
75. Shin K.H., Urtasun R.C., Fulton D., Geggie P.H., Tanasichuk H., Thomas H., Muller P.J. Multiple daily fractionated radiation therapy and misonidazole in the management of malignant astrocytoma. *Cancer* 56: 758-760.
76. Spuler S., Hohlfeld R.(1994). Aktuelle Therapie der multiplen Sklerose: Mitoxantron. *Der Nervenarzt* 65: 136-138.

77. Stewart D.J., Green R.M., Mikhael N.Z., Montpetit V., Thibault M., Maroun J.A.(1986). Human autopsy tissue concentrations of mitoxantrone. *Cancer Treat Rep* Vol 70, No 11: 1255-1261.
78. Stewart D. J., Hugenholtz H., Russell N., Richard M.T., Benoit B., Maroun J.A., Grahovac Z., Girard A., Nabwangu J.F.(1986). Phase 2 study of novantrone (mitoxantrone hydrochlorid) in adults with grade 3-4 astrocytomas. In: Walker M.D., Thomas D.G.T.: *Biology of Brain Tumour*, Martinus Nijhoff, Boston: 411-413.
79. Sweet D.C., Hendler F.J., Hanlon K., Hekmatpanah J., Griem M.C., Duda E.E., Mulligan B., Wollman R.L.(1979). Treatment of grade 3 and 4 astrocytomas with BCNU alone and in combination with VM-26 following surgery and radiation therapy. *Cancer Treat Rep.* 63: 1707-1711.
80. Tonn J.C.(1993). Klinische Relevanz der individuellen in vitro Chemosensitivitätstestung humaner intracranieller Tumoren am Beispiel des Colony Forming Assays und des Methyl-Thiazoyl-Tetrazoliumbromid (MTT)- Tests. *Habilitationsschrift, Würzburg*: 87-90.
81. Tonn J.C., Buhles M., Ehninger G., Korf B., Schuchard U., Schachenmayr W., Roosen K.(1990). Concentrations of mitoxantrone in intracerebral VX2-carcinoma of rabbits. Abstract: *Int Symposium "Advances in Neuro-Oncology" Sanremo*: 133.
82. Tonn J.C., Roosen K., Schachenmayr W.(1991). Brain necroses after intraarterial chemotherapy and irradiation of malignant gliomas - a complication of both ACNU and BCNU ? *J Neuro - Oncol* 11: 241-242.
83. Tonn J.C., Schönmayr R., Rap Z.M., Schachenmayr W.(1989). Autoptic findings after regional ACNU therapy and irradiation in malignant gliomas. *Reg Cancer Treat* 2: 215-222.
84. Unger C., Eibl H., von Heyden H.W., Krisch B., Nagel G.A.(1985). Blut-Hirn-Schranke und Penetration von Zytostatika. *Klin Wochenschrift* 63: 565-571.
85. Unger C., Eibl H., von Heyden H.W., Nagel G., Drube A., Kim D.J.(1985). Blut-Hirn-Schranke: Penetration von Mitoxantron im Vergleich zu anderen klinisch eingesetzten Zytostatika. in: *Supplementreihe FAC 4/2 (Futuramed, München)*.
86. Urtasun R., Band P., Chapman J.D., Feldstein M.L., Mielke B., Fryer C.(1976). Radiation and high-dose metronidazole in supratentorial glioblastomas. *N Engl J Med* 294: 1364-1367.
87. Valtonen S., Timonen U., Toivanen P., Kalimo H., Kivipelto L., Heiskanen O., Unsgaard G., Kuurne T.(1997). Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study. *Neurosurgery* 41: 44-49.

88. Volc D., Jellinger K., Grisold W., Weiss R., Flament H., Wöber G., Aleth G.(1985). Combined radiation and polychemotherapy (COMP) in the postoperative treatment of high grade supratentorial gliomas. In: Voth D., Krauseneck P.: Chemotherapy of gliomas. W de Gruyter, Berlin: 341-352.
89. Voth D., Hüwel N., Al-Hami S., Kühnert A.(1985). Mono-treatment of malignant glioma with a derivate of nitrosourea, ACNU. In: Voth D., Krauseneck P.: Chemotherapy of gliomas. W de Gruyter, Berlin: 361-372.
90. Walker M.D.(1983). The Design and Implementation of Clinical Trials in the Treatment of Malignant Glioma. In: Krauseneck P., Mertens H.G.: Therapie maligner Neoplasien des Gehirns, Perimed Erlangen: 55-65.
91. Walker M.D., Alexander E. jr., Hunt W.E.(1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. J Neurosurg 49: 333-343.
92. Walker M.D., Grenn S.B., Byar D.P., Alexander E. jr., Batzdorf U., Brooks W.H., Hunt W.E., MacCarty C.S.(1980). Randomized comparison of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. N Engl J Med 303: 1323-1329.
93. Weisbroth S.H., Flatt R.E., Kraus A.L.(1974). The biology of the laboratory rabbit: Chapter 3: Brain and spinal cord. Academic Press, New York and London: 54-56.
94. Wendt T.H. (1990). Tumoren des zentralen Nervensystems.In: Lissner J., Fink U., Radiologie 2 , Enke Verlag Stuttgart: 638-642.
95. Wersall P., Ohlsson I., Biberfeld P., Collins V.P., von Krusenstjerna S., Larsson S., Mellstedt H., Boethius J.(1997). Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. Cancer Immunol Immunother 44: 157-164.
96. West C.R., Avellanosa A.M., Barua N.R., Patel A., Hong C.I.(1983). Intraarterial BCNU and systemic chemotherapy for malignant gliomas: a follow - up study. Neurosurgery 13: 420-426.
97. Westerhausen M.(1988). ACNU - ein Zytostatikum der Nitrosoharnstoffreihe. In: Bamberg M., Sack H.: Therapie primärer Hirntumore. Zuckschwerdt - Verlag: 413-418.
98. Windeyer B.W., Cade I., Churchill-Davidson I., Dische S., Henk J.M., McEwen J.B., Sealy R., Sutherland I., Wand A.J., Watson E.R., Wiernik G., Howard N.(1978). Radiotherapy and hyperbaric oxygen. M.R.C. Working Party Report. Lancet 2: 881-884.
99. Yancey J.M., Ackerman N., Kaude J.V., Googe R.E., Fitzsimmons J.R., Scott K.N., Mancuso A.A., Hacket R.L., Hager D.A., Caballero S.(1987). Gadolinium- DTPA enhancement of VX2 carcinoma of the rabbit kidney on T1 weighted magnetic resonance images. Acta Radiol 28: 479-482.

100. Zenker W.(1985). Feinstruktur des Nervengewebes In: Fleischhauer K., Staubesand J., Zenker W.: Benninghoff Anatomie, Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen, Band 3, Urban u. Schwarzenberg: 47-48.

101. Zuiable A., Maitland J., Nandi A., Clink H.M.,Powles R.L.(1985). Intrathecal mitozantrone for resistant leukaemia. The Lancet, Nov.9: 1060-1061.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Schachenmayr danke ich dafür, daß ich unter seiner Leitung in seinem Institut arbeiten durfte und dort immer Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft erfuhr.

Ferner möchte ich den dortigen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen und hier im Besonderen Fr. Dr. B. Korff ganz herzlich für die vielen Stunden danken, die sie in das Färben meiner histologischen Präparate sowie deren Gegenbegutachtung investiert haben.

Und mein ganz besonderer Dank gilt noch all denen die mich tatkräftig und mit viel Geduld - sei es bei der Betreuung der Tiere, der Durchführung der Computertomographien, der Erstellung der Statistik oder der Umsetzung des Geschriebenen in die gedruckte Form - unterstützt haben, diese Arbeit fertigzustellen.

Lebenslauf

26.10.1957	Als einziges Kind seiner Eltern in Kassel geboren
1963 - 67	Volksschule Kassel-Jungfernkopf
1967 - 68	Internatsschülerin im Gymnasium Waldheimschule Bad Sachsa
1968 - 77	Internatsschülerin im Gymnasium Phillip Melanchthonschule Steinatal Abschluß: allgemeinen Hochschulreife
Okt. 77 – März 78	Ausbildung als Kosmetikerin an der Kosmetik Fachschule U. Rasch in Kassel Abschluß: Diplom-Kosmetikerin
Jan. 79 – Sept. 86	Beschäftigung als angelernte Tierarzhelferin Praxis Dr. med. vet. K. Garbe, Vellmar
Apr. 86 - Mai 92	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Famulaturen:

- a) Innere Medizin bei Prof. Dr. Neuhaus in den Städtischen Kliniken Kassel
- b) Radiologie bei Dres. Amsel / Poursaleh, Kassel
- c) Innere Medizin bei Dr. Bauerle Burgfeld-Krankenhaus, Kassel
- d) Labormedizin bei Dr. Sinterhauf, Gießen
- e) Intensivfamulatur Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten bei Prof. Dr.

Maass,

- Bad Lippspringe
- f) Intensivfamulatur Gynäkologie bei Prof. Dr. Rauskolb, Northeim

Praktisches Jahr:

- a) Innere Medizin in der Medizinischen Poliklinik der Universität Gießen
- b) Chirurgie in der Universitätsklinik Gießen
- c) Wahlfach Radiologie in der Universitätsklinik Gießen

Jul. 92 – Jan. 94	Ärztin im Praktikum in der Abt. für Strahlentherapie der Städtischen Kliniken Kassel
März 94 bis Jul. 99	Kindererziehungszeit nach der Geburt meines Sohnes.
seit Jul 99	Beschäftigung als Assistenzärztin in der Abt. für Strahlentherapie des Klinikum Kassel gGmbH

Kassel, Juni 2001

Johanna Barbara Jendretzky